

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U. N° 33

Année 1938-1939

**RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES
ET SÉROLOGIQUES
SUR LES PNEUMOBACILLES**

Travail du Service de M. R. DUJARRIC de la RIVIÈRE
(Institut Pasteur)

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

**Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)**

présentée et soutenue le 12 juillet 1939

PAR

Jeanne COURTOIS

Pharmacien

JURY { MM. LUTZ, *Président.*
BACH, *Professeur.*
VALETTE, *Maitre de Conférences.*

PARIS

JOUBE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1939

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U. N° 33

Année 1938-1939

RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES
ET SÉROLOGIQUES
SUR LES PNEUMOBACILLES

Travail du Service de M. R. DUJARRIC de la RIVIÈRE
(Institut Pasteur)

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 12 juillet 1939

PAR

Jeanne COURTOIS

Pharmacien

JURY { MM. LUTZ, *Président.*
BACH, *Professeur.*
VALETTE, *Maître de Conférences.*

PARIS

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1939

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. DAMIENS, *Doyen*, O. ✱, ☉ I.
P. LEBEAU, *Assesseur*, O. ✱, ☉ I. Membre de l'Institut.
H. J. LIONNET, *Secrétaire*, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. LEBEAU, O. ✱, ☉ I, Membre de l'Institut.	Pharmacie chimique.
GORIS, O. ✱, ☉ I.	Pharmacie galénique.
DAMIENS, O. ✱, ☉ I.	Chimie minérale.
HERISSEY, O. ✱, ☉ I.	Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ☉ I.	Chimie organique.
LUTZ, ✱, ☉ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✱, ☉ I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, ☉ I.	Zoologie.
DELABY, ✱, ☉ I.	Chimie analytique.
PICON, ✱, ☉ I.	Physique.
MASCRÉ, ☉ I.	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
BACH, ✱, ☉ I.	Botanique générale.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. ✱, ☉ I. — GUÉRIN, O. ✱, ☉ I.

Professeurs honoraires :

MM. BÉHAL, G. O. ✱, ☉ I, et DELÉPINE, O. ✱, ☉ I, Membres de l'Institut.
PERROT, C. ✱, ☉ I, COUTIÈRE, O. ✱, ☉ I, BOUGAULT, O. ✱, ☉ I.
et TASSILLY, O. ✱, ☉ I.

MAITRES DE CONFÉRENCES

FLEURY, ☉ I.	Hydrologie et Hygiène.
BEDEL, ☉ I.	Minéralogie, Législation et Déontologie pharmaceutiques.
RÉGNIER, ☉ I.	Bactériologie.
CHARONNAT, ☉ I.	Chimie et Pharmacie Chimique.
JANOT	Pharmacie galénique et biologie végétale.
VALETTE, ☉ A.	Histoire Naturelle.



CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE, travaux pratiques de 1 ^{re} année.	Chimie générale et pharmaceutique.
GAUTIER, ☉ A, trav. prat. de 2 ^e et 3 ^e année.	Chimie analytique.
PARIS.	Micrographie.
CORRIEZ.	Physique.
N... travaux pratiques de 4 ^e année	Microbiologie.
GUILLOT.	Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique.

Bibliothécaire en chef : M. GARNIER, ☉ A.

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE

A MA GRAND-MÈRE

En témoignage de ma profonde affection.

A MON PÈRE

Mon Premier Maître en Pharmacie

Je dédie cette thèse.

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LUTZ

*Qui nous a fait le très grand honneur
d'accepter la présidence de cette thèse.
Témoignage de respectueuse reconnais-
sance.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR LOUIS MARTIN

Directeur de l'Institut Pasteur
Membre de l'Institut
Membre de l'Académie de Médecine
Grand officier de la Légion d'honneur

A MONSIEUR LE DOCTEUR G. RAMON

Directeur de l'Institut Pasteur de Garches
Membre de l'Académie de Médecine
Commandeur de la Légion d'honneur

A MONSIEUR R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE

Docteur ès Sciences
Chef de Service à l'Institut Pasteur
Auditeur au Conseil supérieur Hygiène publique de France
Officier de la Légion d'honneur

*Qui a bien voulu nous accueillir dans son
Service.*

*En témoignage de vive gratitude et de
sincère attachement pour sa constante bien-
veillance à notre égard.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR ET. ROUX

Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur

A MON MAÎTRE

MONSIEUR LE DOCTEUR LÉVY-BRUHL

Ancien interne des Hôpitaux de Paris
Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur
Chef du Laboratoire central de l'Hôpital Boucicaut

*Qui nous a inspiré le sujet de ce travail
et nous en a permis la réalisation.*

*Qu'il veuille bien trouver ici l'expression
de notre profond dévouement et de notre
vive reconnaissance.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BACH

Dont l'enseignement si vivant et si attachant nous a appris à aimer la Bactériologie.

A MONSIEUR VALETTE

Maitre de Conférences

En témoignage de vive gratitude.

AVANT-PROPOS

Avant d'aborder le sujet de cette thèse nous tenons à exprimer notre infinie reconnaissance à tous les Professeurs qui ont contribué à nous guider dans ce travail.

A M. Deval, notre chef de travaux pratiques de Microbiologique à la Faculté qui, pendant notre séjour dans son laboratoire à l'Hôtel-Dieu, nous a préparée et orientée avec une grande bonté et une sollicitude toute paternelle.

Qu'il trouve ici le témoignage de notre affectueuse gratitude.

Nous prions également, M. le Dr Lévy-Brühl d'agréer l'expression de nos remerciements sincères et nos plus vifs sentiments de reconnaissance. Pendant toute la préparation de ce travail, il n'a cessé de nous apporter une aide précieuse et amicale, nous prodiguant sans cesse ses encouragements et ses conseils éclairés.

A M. le Professeur Bach et à M. Valette, Maître de conférences, qui ont bien voulu faire partie de notre jury, nous adressons nos respectueux remerciements.

Que MM. les Professeurs Boivin et Tréfouel, M. le Dr Nitti trouvent ici l'expression de notre reconnaissance pour leurs bienveillants conseils.

Nous tenons à remercier particulièrement M. Le Dr Chevé qui nous fut d'un si précieux secours dans l'élaboration et la rédaction de ce travail et l'assurons de notre vive gratitude.

Que notre sympathique confrère M. Ferrand, toujours

si cordialement à notre disposition pour la réalisation des photos de cet ouvrage, reçoive également nos bien sincères remerciements.

Nous ne saurions oublier enfin tous les camarades du laboratoire. Les marques d'amitié qu'ils n'ont cessé de nous prodiguer pendant notre séjour à l'Institut Pasteur resteront toujours présentes à notre mémoire.

PLAN

INTRODUCTION.

CHAPITRE I. — *Historique. Classification sérologique.*

- I. Premiers essais (1899-1922).
- II. Classification de Julianelle (1922-1930).

CHAPITRE II. — *Antigènes et haptènes microbiens.*

- I. Caractères généraux.
- II. Complexe glucido-protidique.
- III. Complexe glucido-lipidique.

CHAPITRE III. — *Polyholosides des Pneumobacilles. Leurs rapports avec ceux des Pneumocoques.*

- I. Propriétés générales.
- II. Etude de chaque polyholoside.
Rapport avec les Pneumocoques.

CHAPITRE IV. — *Classification sérologique des souches françaises.*

- I. Préparation des sérums.
- II. Agglutination macroscopique.
 - 1° Principe.
 - 2° Technique.
 - 3° Résultats. Classification.
- III. Précipito-réaction.
- IV. Fixation du complément.

CHAPITRE V. — *Analyse des réactions séro-immunologiques.*

- I. Caractères de l'agglutination macroscopique.
Action de la chaleur et des antiseptiques.
Type d'agglutination.

II. Caractères de l'agglutination microscopique.

III. Epreuve du gonflement de la capsule.

Réaction *in vivo*.

Réaction *in vitro*.

CHAPITRE VI. — *Recherches sur l'antigène glucido-lipidique du Pneumobacille A.*

I. Préparation.

II. Propriétés *in vitro*.

Précipito-réaction.

Fixation du complément.

III. Propriétés *in vivo*.

Toxicité.

Epreuve après chauffage à 100°.

Clivage du complexe. Perte du pouvoir toxique.

CHAPITRE VII. — *Etude d'une souche polyvalente.*

I. Agglutination.

II. Précipitation.

III. Préparation de l'antigène glucido-lipidique.

Réactions polyvalentes.

Saturation dissociée des antigènes.

IV. Pouvoir antigénique sur l'animal.

CHAPITRE VIII. — *Applications.*

I. Diagnostic précoce *in vivo* (gonflement de la capsule).

II. Sérothérapie.

III. Chimiothérapie. Essais expérimentaux.

CONCLUSIONS.

Fréquence des différents types.

Souches polyvalentes.

Antigène glucido-lipidique.

Chimiothérapie.

BIBLIOGRAPHIE.

RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES ET SÉROLOGIQUES SUR LES PNEUMOBACILLES

INTRODUCTION

L'étude immunologique du Pneumobacille de Friedländer nous a paru présenter un intérêt particulier en raison du rôle pathogène que ce microbe peut avoir chez l'Homme.

La classification sérologique des variétés de Pneumobacilles établie, aux Etats-Unis, par les travaux de divers auteurs parmi lesquels il faut citer surtout Julianelle n'a pas été étudiée systématiquement en France, ni même en Europe. La classification sérologique des souches françaises de Pneumobacilles fait l'objet de la première partie du présent travail.

Ces germes, produisant en abondance des substances polysaccharidiques caractéristiques du type auquel ils appartiennent, il nous a paru intéressant d'extraire, suivant la technique aujourd'hui classique de Boivin, un complexe glucido-lipidique du Pneumobacille, complexe dont les propriétés se trouvent étudiées dans la seconde partie de notre sujet.

CHAPITRE I

Historique. Classification sérologique.

I. — Premiers essais.

Le *Pneumobacille* fut découvert en 1883 par Friedländer et son rôle pathogène fut mis en évidence en 1890 par une série d'auteurs, en particulier : Weichselbaum en Allemagne, Netter en France.

Peu après, les méthodes d'analyse séro-immunologique se développèrent (Charrin et Roger, 1889 ; Grüber, Widal, 1896) ; fixation du complément (Bordet et Gengou, 1900).

L'application de ces méthodes au bacille de Friedländer tenta d'assez nombreux chercheurs, mais les résultats restèrent longtemps fragmentaires, contradictoires et dans l'ensemble, peu satisfaisants.

Comme pour les *Pneumocoques*, ce sont les études immuno-chimiques de l'Institut Rockefeller au sujet des polysaccharides microbiens qui firent progresser singulièrement nos connaissances d'ordre sérologique et immunologique sur le groupe des *Pneumobacilles*.

Il convient de citer cependant les travaux antérieurs de divers auteurs : Sicard (1899), Clairmont (1902), Bertarelli (1906) qui nous avaient apporté des données intéressantes sur les réactions sérologiques engendrées par cette famille microbienne au cours des essais expérimentaux. Citons

également les publications de Gernez (1929) sur la déviation du complément au cours des infections pneumobacillaires et celles de divers auteurs sur les réactions sérologiques chez les sujets atteints de la curieuse maladie qu'est le rhinosclérome, due également à un bacille muqueux que nous verrons s'apparenter étroitement au Pneumobacille du type C (Elbert).

II. — Classification de Julianelle.

Mais c'est à l'expérimentation sérologique poursuivie avec persévérance par Julianelle que nous devons la classification qui nous permet aujourd'hui de grouper les Pneumobacilles des divers types. Ces recherches, entreprises dès 1922, avaient abouti à une première ébauche de classement, un petit nombre d'échantillons entrant dans les deux groupes sérologiques A et B. Elles furent reprises par la suite, à la lumière des notions immuno-chimiques établies par les travaux de Dochez, Avery, Heidelberger, Gœbel et leurs collaborateurs sur la famille des Pneumocoques. Les données sur la dissociation des antigènes microbiens en fraction protéinique caractéristique de l'espèce bactérienne, et en fraction glucidique caractéristique du type, furent étendues par ces auteurs à d'autres bactéries capsulées et en tout premier lieu au Pneumobacille.

Cette hypothèse de travail se trouva justifiée et féconde et donna un nouvel essor à l'étude séro-immunologique. Celle-ci fut reprise par Julianelle, en 1926. Son premier travail publié, en 1922, en collaboration avec Small avait abouti au classement de 18 souches, 10 dans le groupe A et 8 dans le groupe B, et ce second mémoire porte sur 30 échantillons dont 15 se révèlent du type A, 6 du type B et 3 du type C.

Voici quelques précisions sur cet important travail :

Les sérums expérimentaux étaient obtenus par inoculation intraveineuse au lapin, à doses croissantes, de suspensions microbiennes tuées par la chaleur, préparées à partir de cultures jeunes (5 à 8 heures), injections poursuivies pendant quatre à cinq semaines à raison de trois par semaine.

Les réactions d'*agglutination* étaient pratiquées sur des émulsions bactériennes vivantes, mises en présence du sérum à étudier à dilution peu élevée (1/5^e). Les résultats étaient notés après une incubation de deux heures au bain-marie à 37°, puis un séjour à la glacière pendant la nuit.

Pour les épreuves de saturation des agglutinines on utilisait des émulsions microbiennes tuées par la chaleur.

La recherche des *précipitines* s'effectuait par la mise en contact de 0 cm³ 2 de sérum avec des dilutions croissantes de substance soluble spécifique des divers échantillons.

Pour réaliser l'*épreuve de la croissance microbienne en filaments* (thread-reaction), on ensemait en bouillon additionné du sérum spécifique de chacun des types, la dilution du sérum variant de 1/5 à 1/1.000.

Enfin, les épreuves de *protection* utilisaient des doses de 0 cm³ 2 de sérum injecté à la souris par voie intrapéritonéale. Ces animaux étaient éprouvés avec des cultures jeunes des diverses souches inoculées à des dilutions variables.

RÉSULTATS.

Les résultats d'*agglutination* positifs à faible dilution de sérum mais de façon très nette (formation d'amas granuleux avec liquide clair surnageant) ont permis d'identifier trois groupes sérologiquement distincts. Sur 30 souches étudiées, 15 se classaient dans le type A, 6 dans le type B et 3 dans le type C. Les 6 dernières, se montrant inagglutinables par tout autre sérum que celui qui avait été pré-

paré avec leurs propres germes pris comme antigènes, sont considérées comme formant le groupe X.

L'épreuve de la *saturation des agglutinines* vint confirmer le caractère spécifique des anticorps agglutinants qui, fixés sur une des souches d'un groupe, n'exercent plus aucune action sur un autre échantillon de ce même groupe.

D'autre part, suivant une suggestion de Goebel et Avery basée sur l'analogie de composition chimique de la substance hydrocarbonée soluble des souches B avec celle du pneumocoque II, la réaction d'agglutination par le sérum pneumococcique II fut appliquée à ces bacilles et se montra nettement positive, alors qu'elle était négative avec les échantillons des autres types.

L'épreuve pratiquée sur les souches B avec les sérums pneumococciques I et III se montra également négative.

Les autres tests sérologiques confirmèrent les données de l'agglutination : l'épreuve de la *précipitation*, pratiquée sur la substance soluble spécifique hydrocarbonée de chaque type fut également positive à des dilutions de 1 100.000 à 1/500.000.

La *culture en filaments*, autre aspect du phénomène de floculation, fournit des résultats étroitement concordants avec ceux de la précipitation et de l'agglutination.

Quant au *pouvoir protecteur*, il n'avait pu être recherché que vis-à-vis des souches A et B, les échantillons du type C étant dépourvus de virulence expérimentale. Là encore, on trouvait une action nettement spécifique du groupe, la protection apparaissant très marquée vis-à-vis des souches homologues, nulle, par contre, pour les souches hétérologues. Notons également que nous retrouvons l'action croisée du Pneumobacille type B et du Pneumocoque II qui se montrent excellents antigènes l'un par rapport à l'autre.

En 1930, paraît un nouveau mémoire de Julianelle qui confirme les données précédentes, en particulier, la distinction des trois types A, B et C.

Ses recherches ont porté cette fois sur 80 échantillons qui se classent ainsi : type A : 42 ; type B : 12, type C : 7 ; germes non classables (groupe X) 19 souches.

Si l'on s'en réfère à l'origine de ces bacilles on relève que la plupart des germes A ont été isolés au cours d'états infectieux chez l'homme (37 affections pulmonaires, 5 supurations diverses),

Le type B, au contraire, est constitué, pour la plus grande part, des échantillons d'origine animale (cobaye, veau, jument).

Par la suite, les recherches de Julianelle ont porté sur une série de bactéries muqueuses voisines du Pneumobacille. En 1934, en collaboration avec M. C. Morriss, il étudie une dizaine de souches de *rhinosclérome* de provenances diverses et les rattache du point de vue immunologique au Friedländer type C, les tests d'agglutination et de précipitation croisées se montrant nettement et spécifiquement positifs.

Cette donnée se trouve confirmée en 1936, par les recherches de Gastings et Sijnders qui ont eu l'occasion d'étudier du point de vue immunologique une cinquantaine de souches de rhinosclérome de provenances géographiques les plus diverses. Tous ces échantillons ont, en effet, fourni des réactions nettement positives d'une part, avec des sérums d'origine rhinoscléromateuse, d'autre part avec le sérum pneumobacillaire C de la classification américaine. Il y a donc là un groupe microbien très homogène, du point de vue de sa constitution immuno-chimique.

Les auteurs hollandais ont étudié un certain nombre de souches de bacilles muqueux d'autre origine : 10 Pneumobacilles dont 6 se révélaient comme du type A, 3 du type B, 1 du type C, puis des germes isolés dans des cas d'ozène au nombre de 30 dont 24 se classaient dans un premier groupe sérologique et 3 dans un second groupe ;

ces résultats concordent, à peu de chose près, avec ceux qu'avaient obtenus Julianelle (1935), qui sur 19 échantillons de bacilles de l'ozène en trouvait 12 agglutinés par un même sérum et 2 se classant dans un second groupe, les 5 derniers se présentant comme hétérogènes.

Le dernier travail de Julianelle (1937) porte sur le *Bacterium lactis aerogenes*, mais n'apporte que des résultats d'attente.

Avant d'exposer nos recherches personnelles qui ont pour base la classification américaine et ses 3 types A, B et C, nous croyons utile de résumer brièvement quelques données sur les antigènes et haptènes microbiens, puis sur les polyholosides du Pneumobacille et leurs rapports avec ceux des Pneumocoques. Ce sera l'objet des chapitres qui vont suivre.

CHAPITRE II

Antigènes et haptènes microbiens

I. — Caractères généraux.

La notion d'antigène microbien résulte des données immunologiques établies par les travaux de nombreux chercheurs à la fin du siècle dernier.

C'est, par définition, une substance d'origine microbienne provoquant par inoculation à l'animal la formation d'anticorps capables de réagir spécifiquement avec elle.

Cette union de l'antigène et de l'anticorps peut être mise en évidence sous plusieurs aspects :

in vitro : agglutination, précipitation, floculation, fixation du complément, etc...,

in vivo : pouvoir immunisant et phénomènes d'hypersensibilité.

Les premiers antigènes connus et étudiés étaient constitués par des cultures totales en milieu liquide, ou des émulsions de corps microbiens en eau physiologique, comprenant un élément protéinique très important, d'où la notion longtemps considérée comme absolue de la nature albuminoïde des antigènes.

Cependant, Maurice Nicolle avait déjà entrevu la com-

plexité de ces phénomènes et avait désigné les bactéries sous cette expression imagée « mosaïque d'antigènes ».

En effet, les méthodes de *dissociation des antigènes* progressaient de divers côtés. Celles qui nous intéressent le plus dans cet essai immunologique sont celles qui reposent sur l'étude des polysaccharides bactériens spécifiques et de leurs propriétés non pas réellement antigéniques mais « hapténiques ».

L'expérimentation poursuivie sur la famille des Pneumocoques a permis de mettre en évidence le rôle immunologique de ces composants non protéiniques de la cellule microbienne. A chacune des trois variétés : Pneumocoques I, II et III correspond un polyholoside de propriétés physiques et de composition chimique déterminées et constantes, caractérisant le type pneumococcique en cause. On trouvera un excellent exposé de ces recherches dans l'article du Dr Pochon (*Revue d'Immunologie*, mars 1937).

Du point de vue immunologique, ces substances, sans être des antigènes véritables, puisqu'elles n'engendrent pas d'anticorps, réagissent d'une façon spécifique extrêmement étroite avec les sérums préparés pour chacun de ces types, d'où le nom d'*haptènes* que leur a donné Landsteiner.

Zinsser les désignait comme des *antigènes résiduels*.

C'est le phénomène de la précipitation qui extériorise avec le plus d'intensité cette réaction vis-à-vis des anticorps du sérum ; elle se produit encore à des dilutions atteignant 1/100.000.

Si ces éléments hydrocarbonés spécifiques présentent un vif intérêt lorsqu'on les considère isolément, la question de leur liaison, d'une part avec les protéines microbiennes, d'autre part avec les lipides, a suscité également de nombreux et importants travaux.

Nous ne pouvons que donner ici un très bref aperçu de ces notions précédemment acquises. On les trouvera expo-

sées de façon détaillée dans l'ouvrage de MM. Dujarric de la Rivière et Kossovitch (cf. bibliographie).

II. — Complexe glucido-protidique.

Ce premier complexe (protéiro-glucidique) a fait l'objet des recherches de l'Institut Rockefeller et a abouti au schéma suivant lequel, les sérums expérimentaux se montrent monovalents ou polyvalents, selon qu'ils ont été préparés à l'aide des germes capsulés normaux ou des bactéries artificiellement décapsulées. Dans ce dernier cas, en effet, la protéine bactérienne, antigène commun à toute l'espèce, injectée aux animaux d'expérience, fournit un sérum qui réagit sur la protéine des divers microbes, qu'ils appartiennent aux groupes I, II ou III.

Au contraire, les sérums préparés avec les bactéries capsulées contiennent des anticorps qui réagissent spécifiquement sur les polysaccharides, lesquels sont distincts pour chaque type.

Il se produit une réaction spécifique du groupe.

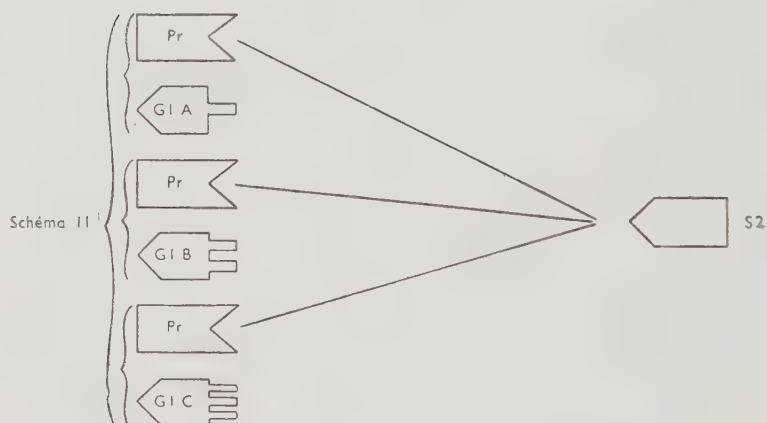
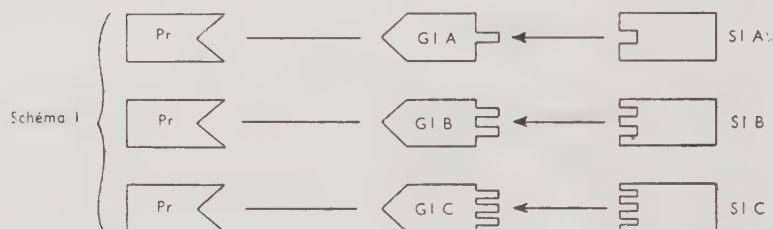
Heidelberger et Avery ont schématisé la réaction suivant le tableau ci-après, applicable du reste à nos trois types A, B, C de Pneumobacilles (voir p. 23).

II. — Complexe glucido-lipidique.

La combinaison glucido-lipidique a fait également l'objet de fort importants travaux dus à Boivin et à ses collaborateurs.

C'est avec les bactéries « Gram-négatives » qu'on peut la mettre en évidence, en l'extrayant des corps microbiens, où elle se trouve associée à des protéines, à des sels minéraux et à des substances hydrocarbonées.

Antigène glucido-protéique (Avery et Mac Neill, 1925).



- Pr : Protéine commune à tous les Pneumobacilles.
 Gl A, B, C : Glucides spécifiques du type.
 S₁ A, B, C : Antisérums spécifiques du type.
 S₂ : Sérum antiprotéique.

Le 1^{er} schéma indique le mécanisme de la réaction vis-à-vis de l'antigène intact. Le 2^e vis-à-vis d'un antigène où les glucides et les protides ont été dissociés.

Dans le premier temps, la récolte microbienne est déprotéinisée par l'action de l'acide trichloracétique N/2. Puis la solution, débarrassée par centrifugation des protéines ainsi précipitées, est soumise à la dialyse qui laisse passer en dehors les substances cristalloïdes : sels, polysaccharides libres, etc.

Il reste à l'intérieur du sac de collodion une solution opalescente dont le Professeur Boivin et ses collaborateurs ont établi les propriétés générales et la constitution.

Cette substance réagit, comme les polysaccharides, d'une façon spécifique avec les sérums expérimentaux. En outre, injectée à l'animal, elle se montre, bien que dépourvue de protéine, nettement antigène puisque le sérum de ces animaux acquiert un pouvoir agglutinant et surtout précipitant très manifeste.

Autre propriété caractéristique, cette substance se montre toxique pour la souris et pour le lapin, entraînant la mort de l'animal en vingt-quatre à quarante-huit heures avec diarrhée et lésions congestives à prédominance intestinale.

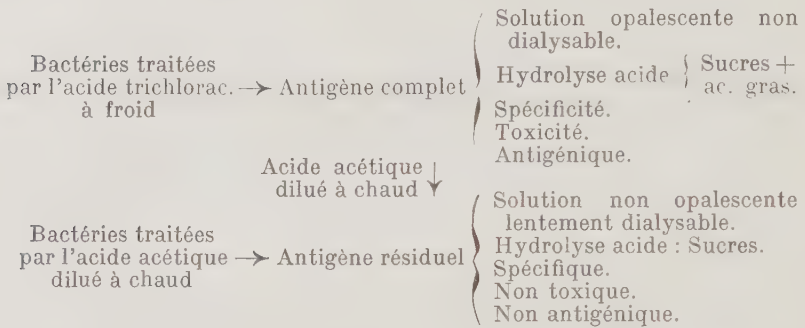
Cette toxine s'oppose par un ensemble de caractères aux exotoxines microbiennes ; de composition chimique non protéinique elle résiste à la chaleur étant dans un milieu à pH 7. Elle résiste également à l'action de certains agents chimiques tel que le formol qui « détoxiquent » les exotoxines.

Elle forme un élément important de l'*endotoxine*. Si au lieu de chauffer cet antigène glucido-lipidique en milieu neutre on procède au chauffage après légère acidification par l'acide acétique, la combinaison se trouve dissociée et ce clivage donne, d'une part un précipité blanchâtre de corps lipidiques, d'autre part le polysaccharide libéré de sa combinaison.

On voit ainsi disparaître à la fois, le caractère toxique et le caractère antigénique du complexe. C'est donc bien lui.

qui s'identifie, d'une part avec l'endotoxine microbienne, d'autre part avec l'antigène somatique de ces bactéries.

Nous pouvons résumer les relations entre antigène complet et antigène résiduel par le schéma suivant :



Ces données capitales établies par Boivin et ses collaborateurs pour une série de germes du groupe typho-paratyphique (*Salmonella*) ; puis pour les dysentériques, le *Proteus*, les Colibacilles, ont été étendues à des germes très éloignés de ceux-ci tels que les Méningocoques.

L'application au groupe des Pneumobacilles ne semble pas avoir encore été réalisée : Nous avons eu l'occasion de le mettre en évidence au cours d'expériences qui se trouvent relatées plus loin.

CHAPITRE III

Polyholosides des Pneumobacilles

Leurs rapports avec ceux des Pneumocoques.

Comme dans le cas des Pneumocoques que nous avons exposé plus haut, la fraction hydrocarbonée des bacilles muqueux caractérise leur spécificité de type.

Chacune des trois variétés A, B, C sécrète en effet une substance *polysaccharidique* bien particulière dont la composition et les propriétés physico-chimiques ont été étudiées et précisées par l'école américaine de l'Institut Rockefeller.

Avant de relater ces précisions pour chacune d'elles, nous exposons les caractères généraux de ces substances.

1. — Caractères généraux.

Ces corps se présentent comme des hydrocarbones non réducteurs mais hydrolysables par les acides avec formation de sucres réducteurs. Ce sont des *polyosides* solubles dans l'eau, dialysables à travers les sacs de collodion et filtrables par les bougies, précipitables par l'alcool.

Du point de vue immunologique, ils se comportent, non

pas comme des antigènes véritables, car ils n'engendrent pas d'anticorps, même après injections répétées chez l'animal d'expérience, mais comme des *Haptènes* (Landsteiner), c'est-à-dire des réactifs spécifiques produisant avec ces anticorps des phénomènes de liaisons caractéristiques (floculation, fixation du complément, etc...).

Injectées à l'animal, elles se montrent atoxiques et dépourvues de tout pouvoir antigénique véritable.

II. — Méthodes employées pour l'extraction de ces polyholosides.

Ces substances s'obtiennent en les séparant de la fraction protéinique du microbe, soit par procédés physiques (filtration à la bougie ou dialyse), soit par des procédés chimiques (précipitation des protéines).

Tœniessen, en 1917, réussit l'isolement de ces polyholosides du Bacille de Friedländer.

Les corps bactériens, après une précipitation par l'alcool en présence d'acétate de soude, sont lavés à l'alcool et séchés. On les obtient ainsi à l'état de poudre.

Avery, Heidelberger et Gœbel réussirent par diverses méthodes à obtenir un polyholoside du Pneumobacille à l'état beaucoup plus pur. Les techniques étaient du reste assez complexes : Après concentration, on opère des séries de précipitations fractionnées par l'alcool. Les protides sont éliminés par l'acide acétique. De nouvelles purifications sont obtenues grâce à des précipitations successives par l'alcool, le sulfate d'ammoniaque à saturation, suivies de dialyse et de précipitation par l'acétone.

Nous avons déjà parlé de la nouvelle méthode du professeur Boivin et nous en donnerons plus loin une description précise.

Il est indispensable d'examiner tout d'abord la compo-

sition élémentaire des polyholosides des trois types différents de *Pneumobacille* et de considérer en même temps leurs analogies, tout spécialement avec les polyholosides des *Pneumocoques*.

FRACTION GLUCIDIQUE DU TYPE A.

Le polyholoside semble composé, d'un dioside encore mal connu, de glucose et d'*acide aldobionique*.

Ce dernier, formé d'une molécule de glucose et d'une molécule d'acide glycuronique peut se caractériser ainsi :

Pouvoir rotatoire	— 100°
C.....	43,9 %
H.....	6 %
N.....	0
Cendres	0
P.....	0
Equivalent acide.....	430

Sucres réducteurs après hydrolyse 65 % (en glucose). Ce polyholoside ne réduit la liqueur de Fehling qu'après hydrolyse et l'ensemble de tous ces caractères le rapproche de la fraction glucidique extraite du *Pneumocoque III*.

Ce dernier présente en effet, un pouvoir rotatoire lévogyre et un équivalent acide également bas.

L'hydrolyse de plus, nous fournit des éléments chimiques analogues.

Malgré les analogies des propriétés de ces deux polysaccharides, on n'a jamais pu mettre en évidence une parenté immunologique. Plusieurs auteurs supposent qu'il s'agit de deux isomères qui diffèrent seulement par le rang de l'atome de carbone liant le glucose et l'acide glycuronique.

FRACTION GLUCIDIQUE DU TYPE B.

Il en est tout autrement si l'on envisage les rapports du Pneumobacille B et du Pneumocoque II. Du point de vue physico-chimique on obtient les données suivantes :

Pouvoir rotatoire	+ 100°
—	—
C.....	44,6 %
H.....	6,1 %
N.....	0
Cendres.....	0
P.....	0
Equivalent acide.....	680

Sucres réducteurs après hydrolyse 70 p. 100 (en glucose).

Ces chiffres se rapprochent beaucoup de ceux fournis par l'étude du polysaccharide extrait du Pneumocoque II. Tous les deux nous fournissent également du glucose à l'hydrolyse.

A cette analogie physico-chimique correspond une parenté immunologique extrêmement étroite, se marquant par l'action croisée *in vitro* comme *in vivo*.

Un sérum, préparé en injectant à l'animal l'un des deux microbes, précipite également bien les deux polysaccharides. Il protège la souris contre l'infection par les deux bactéries en cause.

La mise en évidence d'une telle parenté est une découverte des plus intéressantes de l'immuno-chimie.

FRACTION GLUCIDIQUE DU TYPE C.

Voici les chiffres fournis par l'analyse physico-chimique :

Pouvoir rotatoire	+ 100°
<i>Composition élémentaire :</i>	
C.....	45 %
H.....	5,8 %
N.....	0
Cendres.....	0
P.....	0
Equivalent acide.....	620
Glucose obtenu par hydrolyse.....	75 %

Les fractions protéiniques et lipidiques n'ont pas encore fait l'objet d'études approfondies du point de vue physico-chimique.

Du point de vue immunologique, il semble que pour certains groupes comme les *Pneumobacilles* du type C et surtout les germes du *Rhinosclérome*, il y ait unicité d'antigène protéinique.

Pour les groupes A et B, la chose apparaît jusqu'à présent comme plus complexe.

Nous venons de voir les analogies de nos polyholosides A, B, C avec ceux des *Pneumocoques* mais cette étude physico-chimique présente de plus un caractère assez particulier. En effet, Tœnniessen isola des souches de Bacille de Friedländer un polyholoside très proche du galactane. Or, ce produit est un constituant essentiel de nombreuses espèces de gommés végétales. On sait que M. le Professeur Lutz fit de nombreux et intéressants travaux sur ces substances.

On peut, en particulier de la gomme d'accacia, obtenir par hydrolyse, l'acide galacto-glycuronique isolé à l'état de pureté de son sel de cinchonidine et ce glucide se rapproche singulièrement du polyholoside du Bacille de Friedländer B comme d'ailleurs de celui du *Pneumocoque* II ainsi que l'ont démontré Heidelberg et Kendall.

CHAPITRE IV

Classification sérologique des souches pneumobacillaires françaises

Il nous a paru intéressant de rechercher, en premier lieu, si la classification sérologique établie aux Etats-Unis s'appliquait aux souches isolées en France.

Nous avons pu nous procurer :

D'une part, les étalons A, B, C, grâce à l'obligeance du Dr St. John Brooks, directeur de la « National Collection of type Cultures » de l'Institut Lister, à Londres.

D'autre part, un assez grand nombre de Pneumobacilles dus à l'amabilité des Professeurs Legroux, Rochaix, Lisbonne, de Mme le Dr Aïtoff que nous remercions bien vivement de leur obligeance.

I. — Préparation des sérums expérimentaux.

Les émulsions microbiennes sont préparées à partir de cultures sur gélose, âgées seulement de sept heures, réparties stérilement en ampoules ; il suffit de chauffer ces solutions pendant une heure à 60°, pour obtenir les antigènes utilisables pour l'immunisation.

IMMUNISATION DES ANIMAUX.

Le lapin est l'animal de choix. Les injections sont pratiquées tous les deux jours, à la veine marginale de l'oreille. On commence par des doses assez faibles la première semaine : de 0 cm³, 2 à 0 cm³, 3.

Les animaux présentent toujours au début quelques légers troubles, et on note un amaigrissement assez prononcé. Cependant, dès la quatrième injection, ils supportent très facilement l'augmentation de dose et reprennent même leur poids primitif.

Nous avons réussi à leur faire supporter, après 18 inoculations, 3 cm³ d'émulsion, ce qui provoque la formation d'immunsérums de titre suffisant.

Le lapin est alors laissé au repos pendant dix jours puis saigné à la carotide. Le sérum décanté est réparti en ampoules que l'on conserve à la glacière.

II. — Agglutination macroscopique.

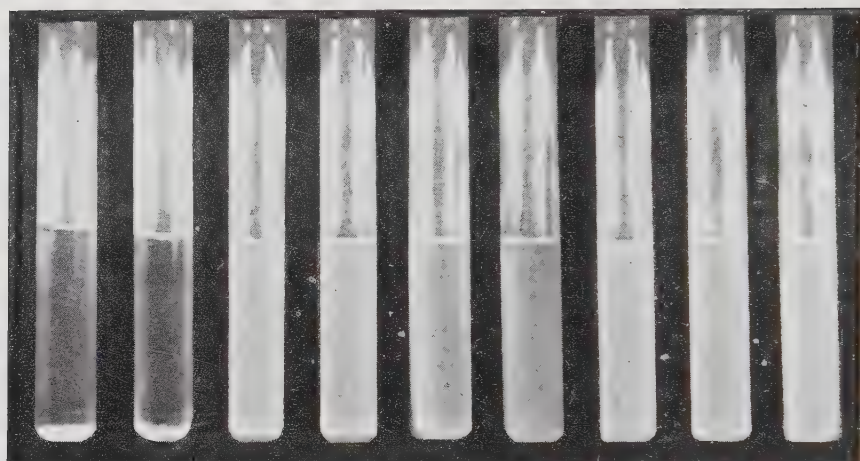
PRINCIPE.

Le sérum présente des propriétés agglutinantes spécifiques. On les met en évidence en mélangeant dans une série de tubes à hémolyse ce sérum en proportions convenables avec une émulsion microbienne.

Préparation de l'émulsion microbienne. — La souche à étudier est repiquée sur gélose. Au bout de cinq heures, cette culture est émulsionnée dans 2 cm³ d'eau physiologique. L'émulsion doit être aussi homogène que possible, sans grumeaux. On ajoute alors la quantité d'eau physiologique nécessaire pour obtenir une opacité identique à une suspension standard titrée à l'avance et correspondant à

PLANCHE I

Agglutination macroscopique de la souche "A"
en présence des différents sérums : A, B, C et N



Sérum A

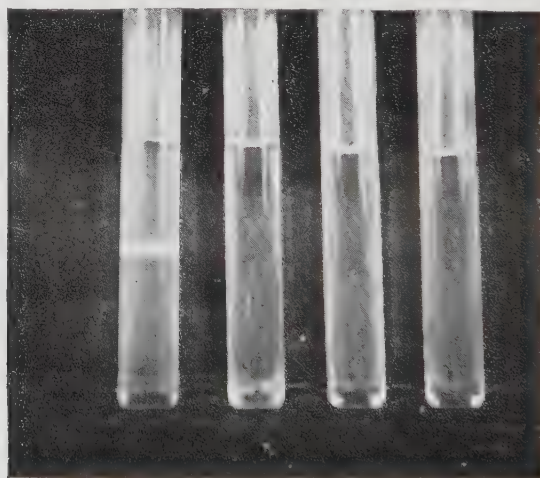
Sérum B

Sérum C

Sérum N

Tem.

Epreuve de la Précipitation de la Souche "A" en présence des différents sérums



Sé. A

Sé. B

Sé. C

Sé. N

(Phot. scientifiques J. Ferrand)

un nombre déterminé de corps bactériens (400.000.000 par cm^3).

TECHNIQUE DE LA RÉACTION.

L'émulsion ainsi préparée est alors répartie à la dose fixe de $0\text{ cm}^3,9$ dans une série de tubes à hémolyse, puis mise en présence des trois immun-sérums respectifs A, B, C, et d'un sérum de lapin normal.

Pour chacune de nos souches à étudier, nous pratiquons deux séries de dilutions : au $1/10$ et au $1/20$, réservant un dernier tube comme témoin de l'émulsion (1). Les sérums sont eux-mêmes éprouvés lors de leur préparation.

TABLEAU I. — AGGLUTINATION MACROSCOPIQUE

Emulsion de la souche à étudier en présence des sérums A, B, C et N.

Emulsion à étudier.	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Sérum A { pur	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—
{ au $1/2$	—	0,1	—	—	—	—	—	—	—
Sérum B { pur	—	—	0,1	—	—	—	—	—	—
{ au $1/2$	—	—	—	0,1	—	—	—	—	—
Sérum C { pur	—	—	—	—	0,1	—	—	—	—
{ au $1/2$	—	—	—	—	—	0,1	—	—	—
Sérum N { pur	—	—	—	—	—	—	0,1	—	—
{ au $1/2$	—	—	—	—	—	—	—	0,1	—
Taux	$1/10$	$1/20$	$1/10$	$1/20$	$1/10$	$1/20$	$1/10$	$1/20$	Témoin émul.
Résultats	+	+	+	+	—	—	—	—	—

Il s'agit d'une souche du type A présentant une agglutination nettement spécifique avec le sérum A.

1. Ce tube ne contient pas de sérum.

RÉSULTATS.

Après une agitation de dix minutes, les tubes sont laissés à l'étuve à 37°, pendant une heure. On fait alors une première lecture, le résultat définitif n'étant noté qu'après un séjour de vingt-quatre heures à la glacière à + 4° C.

1° Dans les tubes où l'émulsion bactérienne est mise en présence d'un sérum normal ou d'un sérum non homologue, le mélange ne présente aucun changement, tout au plus une légère sédimentation des bactéries qui par simple agitation se remettent en suspension donnant des ondes moirées.

2° Au contraire, dans le cas d'un mélange « antigène anticorps spécifiques », le changement s'opère dès les premiers instants d'agitation.

De petits flocons fins, véritables *granulations*, apparaissent tout d'abord. Très vite, ces minuscules agglutinats prennent l'aspect d'*amas* plus ou moins importants suivant les dilutions.

Le liquide s'éclaircit de plus en plus et après le séjour à l'étuve on est en présence d'un mélange parfaitement limpide où l'agitation met en suspension d'importants *flocons* qui retombent assez vite au fond du tube.

Taux d'agglutination. — En opérant avec des dilutions croissantes comme le montre le tableau II, nous avons obtenu un résultat positif jusqu'à une dilution de 1 200. Cette épreuve répétée sur différentes souches donne toujours le même résultat avec le sérum spécifique.

Les auteurs américains n'ont obtenu d'agglutination qu'avec des dilutions de sérum au 1/5.

Cette épreuve sur l'agglutination nous a conduits à une classification de nos 60 souches françaises qui se trouve résumée dans le tableau III.

Ces résultats se trouvent confirmés par l'agglutination microscopique et la précipitation, réactions exposées un peu plus loin.

Si nous rapprochons nos résultats de ceux qui furent publiés aux Etats-Unis, nous notons immédiatement deux différences notables :

1^o La *fréquence relative du type B* dont la proportion atteint presque celle de la variété A.

Sur 60 souches nous notons en effet :

21 A soit.....	35 %
17 B —	28,3
13 C —	21,8
5 polyvalentes.....	8,3
4 négatives	6,6

La statistique américaine au contraire nous donnait :
sur 80 souches

42 A soit.....	52 %
12 B —	15
7 C —	7,5

2^o La présence de souches *polyvalentes* ne paraît pas avoir été signalée jusqu'à présent.

Nous reviendrons plus loin sur ce fait.

TABLEAU II. — RECHERCHE DU TAUX D'AGGLUTINATION LIMITE.

Exemple d'une souche A en présence du sérum spécifique.

Emulsion A.....	0 cc. 9	0 cc. 9	0 cc. 9	0 cc. 9	0 cc. 9	0 cc. 9	0 cc. 9
Sérum A pur ...	0,1	—	—	—	—	—	—
Sérum A au 1/2 .	—	0,1	—	—	—	—	—
Sérum A au 1/5	—	—	0,1	—	—	—	—
Sérum A au 1/10	—	—	—	0,1	—	—	—
Sérum A au 1/20	—	—	—	—	0,1	—	—
Sérum A au 1/500	—	—	—	—	—	0,1	—
Taux	1/10	1/20	1/50	1/100	1/200	1/500	Témoin
Résultats.....	+++	+++	++	+	+	—	—

TABLEAU III RÉSUMANT NOS RÉACTIONS D'AGGLUTINATION

	A	B	C	N
2.....	- +	+ +	+ +	---
1926.....	---	---	+ +	---
Bonneval	+ +	---	---	---
Guill.	+ +	---	---	---
Del.	+ +	---	---	---
Guimb.	+ +	---	---	---
3279.....	---	+ +	---	---
99.....	---	---	+ +	---
Denf.	+ +	---	---	---
S3	---	+ +	---	---
S4	---	+ +	---	---
2074.....	---	+ +	---	---
Gram.....	- +	---	---	---
1842.....	---	- +	---	---
2401.....	---	+ +	---	---
4140.....	- +	---	---	---
Pl.	---	---	---	---
418.....	---	+ +	---	---
Lor.	---	---	---	---
Remy	---	---	+ +	---
2180.....	---	+ +	---	---
1684.....	---	---	- +	---
Sp	---	---	---	---
209.....	---	---	- +	---
2041.....	- +	- +	- +	---
5057.....	+ +	---	---	---
1244.....	---	+ +	---	---
G.....	+ +	---	---	---
Lad.	+ +	---	---	---
2209.....	+ +	---	---	---
P p 4.....	---	---	- +	---
Langle.....	- +	---	---	---
2904.....	+ +	+ +	+ +	---
3024.....	+ +	+ +	+ +	---
S d	---	---	+ +	---
Bord.	- -	- -	---	---
S h	---	---	+ +	---
Des.	+ +	---	---	---
Duf.	---	+ +	---	---
Roch.	---	+ +	---	---
Coll.	---	+ +	---	---
Cesi.	---	+ +	---	---
Carol.	---	---	---	---
Pot.	---	+ +	---	---
3163.....	---	---	---	---
3257.....	---	+ +	---	---
Km	+ +	---	---	---
3187.....	---	---	---	---
Car.	+ +	---	---	---
Pf3.....	+ +	---	---	---
B ₁	---	---	+ +	---
B ₂	---	- +	---	---
Ber.	+ +	---	---	---
RH	---	---	- +	---
Vin.	---	---	+ +	---
3773.....	- -	- -	---	---
Sch.	+ +	+ +	+ +	---
413.....	---	+ +	---	---
Lac.	+ +	---	---	---
1214.....	+ +	---	---	---

III. — Précipito-réaction.

TECHNIQUE,

Les germes sont cultivés sur deux milieux liquides différents, dont voici les formules :

Liquide n° 1 :

Chlorure de sodium.....	5 gr.
Phosphate bipotassique.....	1 gr.
Phosphate d'ammonium.....	1 gr.
Sulfate de magnésium.....	0 gr. 10
Eau distillée..... q. s. p.	1.000 cm ³

A ce milieu de base nous ajoutons 5 gr. de glucose par litre :

Liquide n° 2 :

Chlorure de sodium.....	5 gr.
Phosphate bipotassique.....	2 gr.
Sulfate de magnésie.....	0 gr. 20
Glucose	4 gr.
Asparagine	6 gr.
Eau distillée..... q. s. p.	1.000 cm ³

Après stérilisation et alcalinisation pour amener le milieu à $\text{pH} = 7,2$, il suffit de répartir ces liquides en fioles d'Erlenmeyer et de les ensemercer avec les différentes souches à étudier. Nous avons utilisé des solutions de composition très simple d'où l'emploi de deux milieux liquides. Certaines souches en effet ne poussaient pas sur l'une des solutions : soit la première, soit la deuxième.

Après quarante-huit heures de culture, on élimine les germes du milieu, soit par centrifugation prolongée à

6.000 tours par minute, soit par filtration sur bougie Chamberland L₃.

Dans le liquide obtenu, on vérifie l'absence de corps microbiens par réensemencement en bouillon ordinaire, et on procède à l'épreuve de la précipitation en présence des sérums A, B, C et d'un sérum normal.

Nous appliquons ici la réaction d'*Uhlenhuth*, découverte en 1901 et permettant une classification très rapide et très précise de nos différentes souches à étudier.

Il suffit de verser dans une série de tubes à hémolyse 1 cm³, soit du filtrat, soit du liquide de centrifugation et d'introduire avec précaution 1 cm³ des immunsérums respectifs A, B, C et d'un sérum normal.

On opère avec soin en évitant de mélanger.

Dans les tubes où le filtrat se trouve en présence de l'immunsérum correspondant, on observe rapidement un anneau très net à la zone de contact des deux liquides.

Dans tous les autres tubes rien de tel ne peut être constaté.

Le résultat de cette épreuve concorde étroitement avec celui de l'agglutination comme l'indique le tableau ci-après :

Sur 60 souches nous retrouvons :

21 A soit.....	35 %
17 B soit.....	28,3 %
13 C soit.....	21,8 %
5 polyvalents.....	8,3 %
4 négatives.....	6,6 %

Nous avons signalé les deux différences entre ces résultats et ceux déjà obtenus aux Etats-Unis (fréquence du type B et présence des souches polyvalentes).

Sans insister ici sur l'origine de nos échantillons, indiquons cependant que les souches provenant d'infection chez l'animal (cobaye) se classent dans le groupe B, comme l'a signalé Julianelle.

TABLEAU RÉCAPITULATIF DES CLASSIFICATIONS

BASÉES SUR L'AGGLUTINATION ET LA PRÉCIPITATION

Souches	Agglutinat.	Précipitat.	Souches	Agglutinat.	Précipitat.
1. 2	Polyval.	Polyval.	31. Pp4	C	C
2. 1926	C	C	32. Langle ..	A	A
3. Bonneval.	A	A	33. 2904	Polyval.	Polyval.
4. Guill.	A	A	34. 3024	Polyval.	Polyval.
5. Del.	A	A	35. Sd.	C	C
6. Guimb. ...	A	A	36. Bord.	B	B
7. 3279	B	B	37. Des.	A	A
8. 99	C	C	38. SH.	C	C
9. Denf.	A	A	39. Duf.	B	B
10. S 3	B	B	40. Roch.	B	B
11. S 4	B	B	41. Coll.	B	B
12. 2074	B	B	42. Cesi.	B	B
13. Gram.	A	A	43. Carol.	—	—
14. 1842	B	B	44. Pot.	B	B
15. 2401	B	B	45. 3163.	—	—
16. 4140	A	A	46. 3257.	B	B
17. Pl.	C	C	47. Km.	A	A
18. 418	B	B	48. 3187.	—	—
19. Lor.	A	A	49. Car.	A	A
20. Remy.	C	C	50. Pf3.	A	A
21. 2180	B	B	51. B ₁	C	C
22. 1684	C	C	52. B ₂	A	A
23. SP	—	—	53. Ber.	A	A
24. 1244	B	B	54. RH.	C	C
25. 209	C	C	55. Vin.	C	C
26. 2041	Polyval.	Polyval.	56. 3773	C	C
27. 5057	A	A	57. Sch.	Polyval.	Polyval.
28. G	A	A	58. 413	B	B
29. Lad.	A	A	59. Lac.	A	A
30. 2209	A	A	60. 1214	A	A

IV. — Réaction de fixation du complément.

PRINCIPE.

Le principe de cette réaction fut établi dès 1901 par Bordet et Gengou. Ils constatèrent que l'injection, au lapin, d'hématies de mouton provoque l'apparition d'anticorps capables de lyser *in vitro* les globules rouges de mouton. Cette réaction n'est toutefois possible qu'à la condition d'utiliser le sérum de lapin immu non chauffé.

Bordet et Gengou ont pu mettre en évidence dans le sérum de tous les animaux une substance non spécifique, thermolabile (détruite à $+ 55^{\circ}$) mais dont la présence est indispensable pour provoquer l'hémolyse. Le mélange globules rouges de mouton et sérum hémolytique chauffé n'étant lysé qu'en présence de cette substance appelée complément, ils eurent ainsi à leur disposition un procédé commode pour vérifier dans une solution quelconque l'absence ou la présence de ce complément. Il leur suffisait d'ajouter des globules « sensibilisés » et d'observer s'il y avait hémolyse ou non du complexe.

Ceci devait leur permettre de vérifier la « fixation du complément » au cours d'expériences où le mélange antigène-anticorps-complément ne provoque pas de phénomène apparent.

Après avoir effectué la réaction, il suffit d'ajouter les globules « sensibilisés » qui jouent le rôle d'un véritable indicateur. Deux cas sont à envisager.

1^o L'antigène et l'anticorps sont de même type et le mélange fixe le complément.

Si l'on ajoute les globules de mouton sensibilisés il ne se produit pas d'hémolyse.

2^o Si au contraire nous sommes en présence d'une hété-

rogénéité entre l'antigène et l'anticorps, le complément reste libre et pourra se fixer sur les globules et les lyser.

PRÉPARATION DES ANTIGÈNES.

Pour nos expériences nous partons d'émulsions bactériennes en eau physiologique (à partir de cultures âgées de 6 à 7 heures et chauffées pendant 1 heure à 60°).

L'épreuve préliminaire consiste dans la recherche du *pouvoir anticomplémentaire de l'antigène*, appelé souvent le *titrage de l'antigène*.

Pour cette recherche on met en présence des doses croissantes d'antigènes avec une quantité fixe de complément (lui-même préalablement titré) ; on complète le volume de tous les tubes à 2 cm³ avec de l'eau physiologique ; après une heure d'étuve à 37°, on ajoute le système hémolytique (globules de mouton dilués au 1/20 en eau physiologique et sensibilisés avec une sensibilisatrice « anti-mouton »).

En opérant la réaction avec des doses d'antigènes allant de 0 cm³ 1 à 0 cm³ 5 la dose empêchante a été de 0,4. Pour la réaction on utilise d'habitude la dose immédiatement supérieure (ici 0 cm³ 3).

Réaction proprement dite. — Nous employons deux doses d'antigène : 0,2-0,3 vis-à-vis de chacun de nos sérums-types : A, B, C et d'un sérum normal.

Le tableau ci après résume les réactions :

Les tubes 3, 6, 9, sont des tubes témoins de chacun des sérums et ne renferment pas d'antigène. Ils servent à vérifier l'absence du pouvoir anticomplémentaire des immuns sérums.

Les tubes 12 et 13 sont les témoins de l'antigène.

Après une heure de séjour à l'étuve on ajoute le système hémolytique. Le tube 14 sert de témoin à ce système.

RÉSULTATS.

Après un séjour de vingt minutes à l'étuve on note déjà une hémolyse très nette dans tous les tubes témoins et dans les tubes 10 et 11 contenant le sérum normal.

Une absence d'hémolyse nous indiquant un résultat positif est constatée dans tous les tubes renfermant un mélange émulsion-sérum anti.

Mais contrairement à toutes nos réactions précédentes, soit agglutination, soit précipitation, aucune spécificité pour les trois groupes A, B, C, n'est mise en évidence.

La lecture finale est faite après un séjour de trente minutes à l'étuve.

Ainsi l'agglutination, la floculation et la précipitation sont nettement spécifiques du type.

Par contre, la sensibilisatrice fixant le complément apparaît comme très distincte de ces anticorps et caractérise l'espèce microbienne.

PLANCHE II

Réaction de Fixation du Complément de la Souche A

I	II	III	IV	V	VI	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
---	----	-----	----	---	----	----	-----	------	----	---	----	-----	------	-----	----



(Phot. scientifiques J. Ferrand).

FIXATION DU COMPLÉMENT

Tube	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
			T. S. A			T. S. B			T. S. C			T. S. N	Tem. séruls		C. S. N
Emulsion A.	0,2	0,3	0	0,2	0,3	0	0,2	0,3	0	0,2	0,3	0	0,2	0,3	0
Sérum A.	0,2	0,2	0,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérum B.	—	—	—	0,2	0,2	0,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérum C.	—	—	—	—	—	—	0,2	0,2	0,2	—	—	—	—	—	—
Sérum N.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	0,2	0,2	—	—	—
Complément titré.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Eau physiol. 8,5‰.	1,5	1,4	1,7	1,5	1,4	1,7	1,5	1,4	1,7	1,5	1,4	1,7	1,7	1,6	1,9

Etuve à 37° 45 minutes

Globules de mouton au 1/20 sensibilisés.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Résultats.	+	+	—	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—

Etuve 20 minutes

CHAPITRE V

Analyse des réactions séro-immunologiques

I. — Caractères de l'agglutination macroscopique.

Des travaux récents ont mis en lumière les divers aspects que peut revêtir le phénomène si intéressant de l'agglutination ; aspects qui sont dus, en réalité, à l'action des anticorps sur des antigènes bactériens différents.

Ces recherches ont porté avant tout sur des bactéries mobiles, munies de cils, tels que le Bacille typhique qui fut l'objet des retentissants travaux de Widal (1896) qui fournirent la première application pratique du séro-diagnostic.

Puis ce fut sur une autre bactérie mobile le « *Proteus* » que les premières études de Weil et Félix (1915) aboutirent à la distinction des antigènes H et O.

L'antigène H ou flagellaire est lié à la présence des cils dans l'émulsion microbienne. Du point de vue physico-chimique, il est caractérisé par sa *thermolabilité* (destruction par chauffage à 70°). Il est détruit également par certains antiseptiques tels que l'alcool absolu.

L'antigène O, par contre, provient des corps microbiens proprement dits et se montre *thermostable*. Un chauffage à 100° pendant une heure ne l'altère nullement. Il résiste

également aux agents chimiques (alcool absolu, acide phénique).

Du point de vue *immunologique*, l'*antigène H* détermine la formation d'anticorps H dont l'action se marque par une agglutination caractéristique très nette. Elle est extrêmement rapide, presque immédiate et réalise des flocons très volumineux qui s'amassent au fond du tube mais se laissent dissocier assez facilement.

Au contraire, l'*antigène O* produit par injections à l'animal des anticorps O dont l'action se manifeste *in vitro* par une agglutination d'un type tout différent. Elle se produit de façon beaucoup plus lente et les agglutinats ont la forme de grains assez fins mais se dissocient incomplètement par agitation.

Les germes des *Salmonella* trouvés dans la nature contiennent en général l'antigène H et l'antigène O. Leur inoculation à l'animal donne des sérums qui contiennent à la fois les anticorps H et les anticorps O. Certains artifices de laboratoire permettent d'obtenir la dissociation de ces antigènes.

L'ensemencement sur boîtes de gélose a permis quelquefois d'observer des colonies d'aspect différent. Les unes présentent une confluence en nappe qui leur a valu précisément la qualification de « Hauch » (nappe en allemand) (H). Les autres dépourvues de cette apparence sont qualifiées de « sans nappe » O (ohne Hauch).

Utilisant d'autre part, la propriété thermolabile de l'antigène H, on peut, par ébullition de courte durée, préparer des émulsions où subsiste seulement l'antigène O. Des souches purement de type O peuvent aussi d'une façon toute exceptionnelle se rencontrer dans la nature ; on peut encore les obtenir par culture des bactéries sur gélose additionnée de phénol.

Cet antigène O ou *somatique* est identifié, rappelons-le, par les travaux du Professeur Boivin avec l'antigène glu-

cido-lipidique dont nous avons pu étendre l'application au groupe des *Pneumobacilles*.

Ces notions, aujourd'hui classiques, mais qui font l'objet de multiples recherches complémentaires, se trouvent fort bien exposées dans la thèse toute récente du Dr Payet (1939).

Elles avaient également fait l'objet d'un chapitre fort important de la monographie de MM. Dujarric de la Rivière et Kossovitch (1937).

Nous avons été tentée d'interpréter, à la lumière de ces notions les faits observés par nous au cours de l'agglutination des *Pneumobacilles* par les sérums expérimentaux. A première vue, les caractères des agglutinats tendraient à les rapprocher du phénomène agglutinatif II. La rapidité extrême de la production, la grosseur des flocons se classent parmi les faits les plus frappants, et se trouvent d'ailleurs signalés par divers auteurs.

Mais il ne s'agit certainement pas d'antigènes flagellaires véritables comme dans le cas des *Salmonella*.

D'autre part, l'épreuve de la résistance à la chaleur montre une thermostabilité au moins relative. Ainsi, à 70°, le chauffage prolongé pendant plus d'une heure ne modifie pas l'aspect du phénomène. De même, l'ébullition pendant trente minutes laisse intacte la rapidité et l'intensité des formations agglutinatives.

Si l'on prolonge cette ébullition, on voit par contre se modifier sensiblement les caractères de la réaction. Les gros amas se transforment en grains assez fins, réguliers et bien arrondis.

On ne peut donc assimiler ce type d'agglutination aux formes H véritables. Cependant on se trouve en présence d'une réaction agglutinative qui semble nettement distincte du type O auquel il laisse la place par ébullition prolongée.

Nous nous proposons de comparer à l'action de ces

sérums expérimentaux celle des sérums que nous préparons actuellement avec des antigènes glucido-lipidiques injectés à une nouvelle série de lapins. Sans doute, obtiendrons-nous une réaction d'agglutination de type nettement somatique.

II. — Agglutination microscopique.

On dépose sur une lame, une goutte d'émulsion microbienne et une goutte d'un sérum spécifique. Après avoir mélangé intimement les II gouttes, on les recouvre d'une lamelle et on examine la préparation au microscope.

Pour faciliter l'observation, nous ajoutons au préalable une trace de colorant. Après plusieurs essais nous avons obtenu les meilleurs résultats avec un *Bleu de Löeffler* suivant la formule :

Bleu de méthylène à 10 %.....	3 parties
Solution de potasse non carbonatée à 1 pour 10.000 ..	10 parties

En présence du sérum spécifique, les bacilles se groupent rapidement, *s'agglutinent* en amas plus ou moins volumineux, laissant entre eux des espaces parfaitement clairs.

Les mouvements browniens souvent si marqués se trouvent abolis.

Au contraire, un sérum normal ou un sérum d'un type différent offre un champ tout parsemé de bacilles isolés et répartis de façon très homogène.

Ces relations confirment ainsi les phénomènes d'agglutination macroscopique, mais un fait plus curieux s'ajoute à nos observations, le gonflement de la capsule du microbe.

RÉACTION « IN VIVO ».

Epreuve sur la souris : on injecte à la souris une émulsion de Pneumobacille en eau physiologique à la dose de 0 cm³,2 dans le péritoine ou de 0 cm³,5 sous la peau.

On prélève 1 goutte de sérosité péritonéale, six heures environ après l'inoculation. On la mélange soigneusement avec 1 goutte de l'immunsérum. On observe alors un résultat analogue en tous points, au précédent.

On pourrait même noter une intensité plus marquée par cette épreuve *in vivo* et le gonflement de la capsule subit une courbe présentant les mêmes caractères que précédemment.

Ces mêmes expériences furent faites sur le cobaye et les injections soit intrapéritonéales, soit sous-cutanées, nous fournirent toujours un résultat analogue.

Cette simple épreuve permet ainsi d'opérer un *diagnostic* extrêmement rapide et précis sur l'identification du groupe auquel appartient l'espèce bactérienne envisagée.

Cette pratique est déjà usitée dans certains hôpitaux américains et conduit au traitement précoce par une sérothérapie spécifique (Bullowa).

CHAPITRE VI

Recherches sur l'antigène glucido-lipidique du *Pneumobacille* A

I. — Principe.

Rappelons le principe de la préparation de cet antigène déjà exposé au chapitre III, ainsi que ses propriétés générales.

On traite les bactéries par l'*acide trichloracétique*, qui provoque la coagulation des protéines bactériennes et laisse diffuser de nombreuses substances « acido-solubles », sels minéraux, sels ammoniacaux, acides aminés, nucléotides, nucléosides, etc..., tous corps dialysables, et antigène complet à grosse molécule, donc non dialysable.

L'extrait trichloracétique soumis à la dialyse nous donne ainsi une sorte d'émulsion de l'antigène complet.

II. — Préparation de l'antigène complet du *Pneumobacille* A.

TECHNIQUE DU PROFESSEUR BOIVIN.

Parmi les nombreux déprotéinisants (acide trichloracétique, sulfosalicylique, picrique, tungstique, phospho-

tungstique, plusieurs sels métalliques : sels de cuivre, de plomb, de zinc, de mercure, d'uranyle) l'*acide trichloracétique* est celui qui fournit le rendement maximum.

Nous avons donc suivi point par point la technique préconisée par le Professeur Boivin et ses collaborateurs (L. et J. Mesrobeanu) pour notre travail sur les Pneumobacilles.

1° Les bactéries sont cultivées pendant vingt-quatre heures à $+ 37^{\circ}$ sur gélose en boîtes de Roux ;

2° On les recueille en les émulsionnant avec de l'eau physiologique et la séparation des corps microbiens s'opère grâce à une centrifugation prolongée et à grande vitesse (au moins 6.000 tours pendant 1/2 heure) ;

3° La purée bactérienne obtenue est mise en suspension dans de l'eau distillée et diluée, de telle sorte que 1 cm³ corresponde à 0 g., 2 de microbes frais.

On ajoute un égal volume d'*acide trichloracétique* demi-normal et, après agitation, on abandonne pendant deux heures à la glacière.

4° Après ce premier temps dans la marche des opérations, on centrifuge à nouveau et l'on obtient ainsi un extrait trichloracétique jaune et opalescent ;

5° Cet extrait est alors réparti dans des sacs de collodion (collodion acétique à 5 % coagulé par l'eau), et il reste à *dialyser* pendant deux jours contre un courant d'eau ordinaire. On élimine ainsi les substances minérales, hydrocarbonées et protéiques ayant pu diffuser des corps bactériens.

On continue pendant une troisième journée la dialyse contre un grand volume d'eau distillée et on obtient ainsi une émulsion pratiquement neutre, incolore et opalescente du complexe antigénique.

6° Il nous suffit de *stériliser* la solution par filtration sur bougie Chamberland L₃ ;

La richesse de notre extrait en complexe antigénique

nous est facilement indiquée par évaporation à 100° de 1 cm³ d'émulsion.

Nous pesons l'extrait sec obtenu ce qui nous fournit 2 mg., 5 par cm³.

III. — Propriétés de l'antigène glucido-lipidique du *Pneumobacille A*.

Notre complexe présente tous les caractères physico-chimiques décrits par le Professeur Boivin dans ses travaux sur le bacille d'Aettrycke, puis sur les *Salmonella*, *Bactérium coli*, *B. dysentérique*, *Proteus*, *Vibrion cholérique*, *B. Pyocyanique*, etc... : opalescence, absence de dialyse, réactions des protéines négatives (Tanret, Biuret, etc.).

PROPRIÉTÉS IMMUNOLOGIQUES « IN VITRO ».

Avec notre complexe, nous avons refait nos expériences vérifiant la spécificité du type et tout particulièrement l'épreuve de la précipito-réaction.

Avant l'emploi, la solution de l'antigène glucido-lipidique dialysée est additionnée de ClNa pour la rendre isotonique (8,5 ‰).

PRÉCIPITO-RÉACTION.

En partant de notre suspension glucido-lipidique A, nous reprenons la technique de la réaction d'*Uhlenhut*.

Si l'on met en contact 0 cm³, 1 de dilution dans un tube de diamètre étroit avec 0 cm³, 1 d'un sérum A, il se produit immédiatement à la limite des deux liquides un anneau très net.

Dans le cas des sérums B, C ou normal, la zone de contact n'offre rien de particulier.

En diluant de plus en plus notre antigène nous arrivons encore à percevoir un anneau jusqu'au 1/10.000.

EPREUVE DE LA FIXATION DU COMPLÉMENT.

En partant de notre solution glucido lipidique A, nous pratiquons l'épreuve de la fixation du complément en présence des sérums A, B, C et N.

Le titrage de l'antigène s'opère en ajoutant à des doses croissantes d'antigène, une quantité fixe de complément, lui-même titré au préalable.

Nous employons des doses de solution glucido-lipidique de 0,05 0,08, 0,10, 0,12, 0,15, 0,18. 0,2 (1 cm³ correspond à 2 mg., 5 d'antigène sec).

Après avoir complété à 0 cm³, 25 avec de l'eau physiologique on continue comme dans un titrage ordinaire (0 cm³, 1 de complément titré et 0 cm³, 5 du système hémolytique).

Dans aucun tube nous n'avons constaté d'arrêt de l'hémolyse du système globules rouges de mouton sensibilisés. L'antigène ne présente donc pas de pouvoir anti-complémentaire. On opère alors la réaction suivant la même technique employée précédemment avec une émulsion bactérienne.

Les tableaux suivants nous résument le titrage de l'antigène et la réaction proprement dite.

Pour cette réaction nous employons deux doses croissantes du complexe glucido-lipidique : 0 cm³, 1 et 0 cm³, 2 et nous les mettons respectivement en présence d'une dose *fixe* de chacun des sérums A, B, C et N et d'une quantité également fixe de complément titré.

Les tubes 3, 6, 9, 12 ne contiennent pas d'antigène et sont les témoins sérums.

Les tubes 13 et 14 sont les témoins antigène et le tube 15 le témoin du système hémolytique.

Après un séjour d'une heure à l'étuve à 37°, il suffit d'ajouter partout 0 cm³, 5 de globules de mouton dilués au 1/20 et sensibilisés au préalable.

RÉSULTATS.

Nous obtenons un résultat absolument superposable à celui de la réaction de fixation dans le cas de l'émulsion bactérienne. Nous avons vérifié l'absence de protéines dans le complexe glucido-lipidique par les réactions de Tanret et du Biuret négatives. Nous pouvons donc éliminer l'hypothèse d'un antigène protéinique présent dans la solution.

Nous avons vu précédemment que l'élément glucidique ne réagit qu'avec le sérum homologue. Il se montre spécifique du type.

Par conséquent, dans cette épreuve de fixation du complément, le seul élément auquel nous pouvons attribuer un rôle polyvalent n'est autre que le lipide qui dans ce cas se montre spécifique de l'espèce.

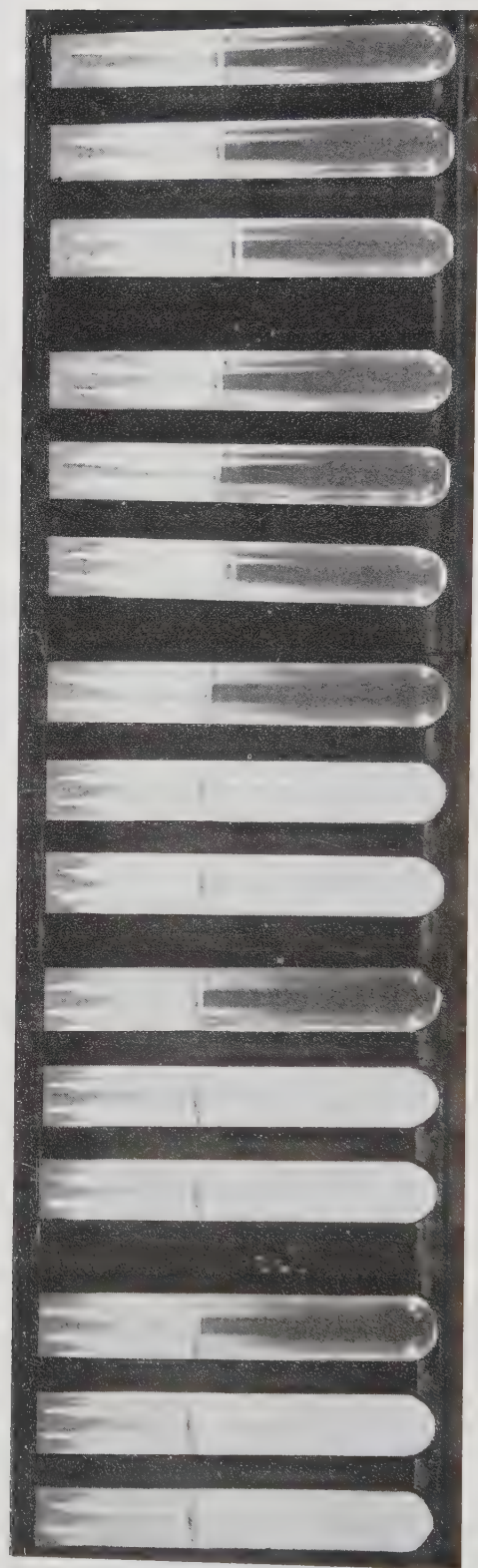
On sait en effet qu'actuellement la conception antigénique des lipoïdes est admise par les auteurs. C'est précisément dans les réactions de fixation du complément que ces substances jouent le rôle plus important (Sachs).

TITRAGE DU COMPLEXE GLUCIDO-LIPIDIQUE A
POUR LA RÉACTION
DE FIXATION DU COMPLÉMENT

Antigène glucido-lipidique ..	0,05	0,08	0,10	0,12	0,15	0,18	0,2	0
Eau physiologique à 8,5 ‰.	0,20	0,17	0,15	0,13	0,10	0,07	0,05	0,25
Complément titré	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Eau physiologique à 8,5 ‰.	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65
Globules sensibilisés	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Etuve 1/2 heure à + 37°								
Résultats	+	+	+	+	+	+	+	—

PLANCHE IV

Réaction de Fixation du Complément avec l'Antigène glucido-lipidique A



I II III IV V VI VII VIII IX X XI XII XIII XIV XV

(Phot. scientifiques J. Ferrand).

ÉPREUVE « IN VIVO ».

Nous avons éprouvé la toxicité de l'antigène glucido-lipidique chez la Souris, par voie intrapéritonéale et sous-cutanée.

Par voie péritonéale la dose de 2/10 de cm³ d'une émulsion de l'antigène correspondant à 1 mg. de substance sèche amène la mort en trois heures. L'animal présente quelques secousses dans la période qui précède la mort, puis tombe dans un état de profonde somnolence.

La voie sous-cutanée se montre également efficace, mais la période de survie atteint deux à trois jours pendant lesquels l'animal se montre nettement abattu, le poil est hérissé, les yeux clos. Nous n'avons pas noté de diarrhée.

L'ébullition, prolongée pendant huit minutes, n'affaiblit pas sensiblement ce pouvoir toxique puisque les souris injectées avec l'antigène ainsi traité succombent dans les mêmes délais que les précédentes.

Ceci confirme les données apportées par le Professeur Boivin et ses collaborateurs sur la thermostabilité de la toxine glucido-lipidique en milieu neutre.

CHAPITRE VII

Etude d'une souche polyvalente

Nous avons déjà signalé (1) la présence d'un petit nombre de souches sensibles à la fois à l'action des sérums A, B et C.

Actuellement, sur 60 souches : 5 ont manifesté cette polyvalence (soit 8,5 %).

I. — Agglutination.

La réaction d'*agglutination* avait déjà mis en évidence cette particularité que les épreuves de précipitation confirment.

Nous avons plus spécialement étudié la souche « 2 » provenant d'un cas d'infection urinaire chez l'homme. Nous en avons extrait l'*antigène glucido-lipidique* d'après les procédés décrits plus haut au sujet de la souche A et nous avons répété les épreuves avec ce nouveau complexe.

II. — Précipitation.

La réaction de *précipitation* a donné avec chacun des sérums A, B et C un anneau très net se produisant jus-

1. C. R. Soc. de Biologie, t. CXXVIII, p. 982, 9 juillet 1938.

qu'à une dilution de 1/1.000, alors que plusieurs sérums normaux restaient sans action. Ces anneaux présentent la même intensité pour chacun des trois sérums.

Il ne s'agit donc pas de « coprécipitines » mais d'une véritable *précipito-réaction* polyvalente.

Pour éliminer la possibilité d'une culture mixte comprenant des éléments microbiens A, B et C nous étions partis de colonies soigneusement isolées qui ont fourni régulièrement les mêmes résultats.

III. — Saturation fractionnée.

On réalise une première précipitation du complexe glucido-lipidique en le mettant au contact du sérum A. Il se forme un anneau abondant. On s'assure que le liquide surnageant ne donne plus de précipitation avec une nouvelle quantité de sérum A. On recommence ensuite la même épreuve sur ce liquide avec du sérum B.

Nous amenons ainsi la formation d'un deuxième anneau aussi abondant que le précédent. Après s'être assuré que le liquide surnageant ne donne plus de précipitation avec une nouvelle dose de sérum B on effectue la troisième épreuve avec du sérum C.

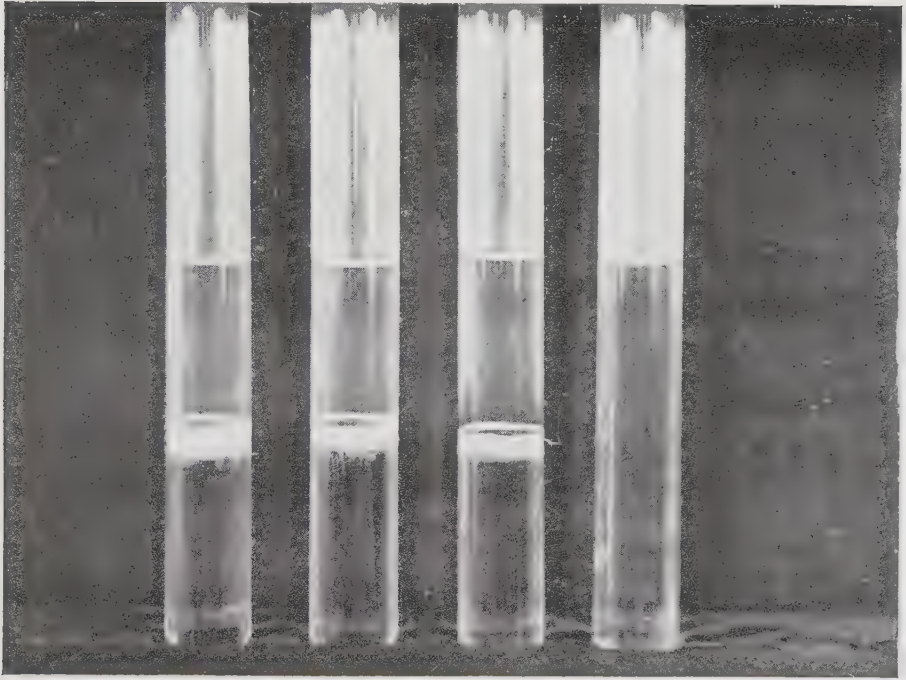
On obtient de cette façon un autre anneau de même abondance que dans les deux cas précédents.

Nous avons donc ainsi réalisé une *saturation fractionnée* des trois antigènes contenus dans notre complexe glucido-lipidique.

IV. — Pouvoir antigénique.

Avant d'entreprendre ces épreuves de saturation, nous nous étions assurée que la solution glucido-lipidique ne contenait pas de protéine par les réactions du Biuret et de Tanret.

Réaction de Précipitation de l'Antigène glucido-lipidique
de la Souche polyvalente



Sé. A

Sé. B

Sé. C

Sé. N

(Phot. scientifiques J. Ferrand).

Notre souche polyvalente doit vraisemblablement fournir à la fois les polysaccharides A, B et C.

L'injection au lapin de doses répétées et croissantes de cet antigène glucido-lipidique nous procurera un sérum dont la polyvalence sera éprouvée vis-à-vis des trois types.

Cette question est donc encore à l'étude et nous paraît particulièrement intéressante, aucun travail n'ayant déjà signalé ce fait en ce qui concerne les *Pneumobacilles*.

Certains auteurs parlent assez couramment de Pneumocoques I + II ou I + III ou II + III, mais ces recherches ne paraissent pas avoir fait l'objet d'un travail systématique permettant de tirer des conclusions fermes.

CHAPITRE VIII

Applications. Chimiothérapie

I. — Diagnostic précoce « in vivo ».

En présence d'un malade atteint d'une suppuration à Pneumobacille, le procédé du *gonflement de la capsule* permet, comme pour le Pneumocoque, le diagnostic précoce du type microbien en cause.

II. — Sérothérapie.

On pourrait donc essayer d'utiliser un *sérum thérapeutique* spécifique : pratique actuellement usitée depuis quelques années dans les hôpitaux américains.

Cependant des traitements basés sur des recherches toutes différentes ont fait leurs preuves dans ces derniers temps.

III. — Chimiothérapie.

Les progrès de la Chimiothérapie en effet prennent un développement de plus en plus considérable dans le domaine des maladies infectieuses.

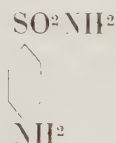
Le 15 février 1935, Domagk, Mietsch et Klarer découvrirent en effet une substance nouvelle permettant de traiter efficacement les streptococcies expérimentales.

Il s'agissait d'un colorant azoïque : la Sulfamidochrysoïdine appelé également le Prontosil I de formule :



C'est en étudiant des corps voisins que M. et Mme Tréfoüel, Nitti et Bovet purent démontrer, peu de temps après, la coupure du colorant dans l'organisme, avec libération d'un produit qui, tout en présentant des propriétés physiques et chimiques différentes, se montre plus actif du point de vue de son pouvoir antistreptococcique.

Il s'agit du *paraminophénylsulfamide* ou 1162 F dont la structure chimique présente un noyau benzénique portant une fonction sulfamide SO^2NH^2 et en para : une fonction amine



Ce corps se montre très peu toxique pour les animaux de laboratoire : la Souris de 20 gr. supporte 50 mgr. de produit par voie buccale.

Les expériences cliniques sur le 1162 F se sont alors multipliées en particulier à l'Institut Pasteur dans les laboratoires de MM. Fourneau et Salimbéni par M. et Mme Tréfoüel, Nitti et Bovet.

L'activité du 1162 F fut étendue alors aux pneumococ-

cies, streptococcies, méningococcies, colibacilloles, gonococcies, affections du groupe typhique et même assez récemment aux lymphogranulomatoses inguinales (maladie de Nicolas-Favre), trachome et même paludisme.

Au premier abord, le Bacille de Friedländer ne se montra pas sensible à cette chimiothérapie.

Levaditi et Vaisman ne trouvèrent aucune action protectrice du Protonsil I sur la Souris atteinte d'affection pneumobacillaire.

Bien qu'il soit possible, comme l'a montré Buttle, d'observer un retard de la mort des animaux traités vis-à-vis des témoins, en administrant des doses très élevées de 1162 F, il est exceptionnel de constater des survies définitives.

Récemment, Gross, Cooper et Lewis (1938) n'ont pas confirmé cette action, ne signalant aucune activité des sulfamides et de certaines sulfones, telles le 1399 : diacétylaminodiphénylsulfone sur le B. de Friedländer. Par contre, quelques résultats intéressants ont cependant été publiés : Lombard et Monzain-Lemaire (1938); P.K. Brown (1938).

De même, Long aurait obtenu des résultats favorables en utilisant un dérivé du 1162 F. : la *sulfamidopyridine* ou corps 693 MB.

De notre côté, grâce à l'obligeance du Dr Nitti, il nous a été possible de constater l'effet protecteur de certains corps vis-à-vis de deux souches particulièrement virulentes.

L'une : le type B étalon américain « 5055 » du « Lister Institute » et l'autre « Carol » d'origine française provenant d'un cas de cholécystite compliquée d'abcès du foie.

TECHNIQUE.

Une culture de dix-huit heures sur gélose de la souche « Carol » est diluée dans un tube de bouillon de telle sorte que l'émulsion mère représente 8 milliards de germes.

A partir de cette émulsion on prépare des séries de dilutions croissantes allant jusqu'à 10^{-9} .

Pour une première expérience on utilise 2 lots de 10 souris dont l'un servira de témoin.

Les animaux des 2 séries reçoivent une dose de culture correspondant à 8 millions de germes, par injection intrapéritonéale, ce qui représente environ 1 million de doses mortelles.

L'un des lots, une demi-heure avant l'inoculation, a absorbé 10 mgr. de 1162 F. Les survivants reçoivent la même dose les jours suivants.

Le tableau suivant nous indique les résultats.

Action du 1162 F sur des souris inoculées avec une souche virulente de Pneumobacille « Carol ».

Emulsion mère : 8 milliards..... + = mort

Injection : 10^{-3} le 21 mars..... V = survie

	22	23	24	25
Témoin	+			
	+			
	+			
	+			
	+			
	+			
	+			
	+			
	+			
	V			
	V	+		
	V	V		
	V	V	+	
	V	V	+	
1162 F	V	V	+	
	V	V	+	
	V	V	+	
	V	V	+	
	V	V	V	+
0 gr. 02	V	V	V	+
	V	V	V	+

Au bout de vingt-quatre heures on constate la mort de tous les témoins.

Par contre les 10 souris traitées survivent.

Au bout de quarante-huit heures une seule d'entre elles a succombé.

Mais après trois jours, 7 souris sont mortes et les 3 survivantes succombent le quatrième jour.

Il y a donc un retard manifeste dans l'évolution fatale de la maladie d'autant plus frappant que le mode d'infection réalisé est particulièrement sévère (1 million de doses mortelles).

Ces premiers résultats paraissent très encourageants pour la poursuite de ces recherches dont l'application en clinique pourra présenter un réel intérêt.

CONCLUSIONS

I. — Grâce à la préparation de sérums expérimentaux correspondant aux trois types de la classification américaine des Pneumobacilles : A, B et C, nous avons pu étudier 60 souches isolées en France et les faire entrer, dans 90 % des cas, dans l'un de ces trois groupes. Cette enquête sérologique nous a révélé deux caractères importants différant de ceux étudiés aux Etats-Unis :

- 1^o La fréquence relative du type B qui se rencontre presque aussi souvent que le type A au cours des infections humaines ;
- 2^o L'existence de souches polyvalentes qui ne semblaient pas connues.

II. — A la lumière des travaux récents sur la dissociation des antigènes, particulièrement étudiée dans le groupe des *Salmonella*, nous avons analysé les caractères des réactions séro-immunologiques réalisées. L'*agglutination macroscopique* se rapproche par certaines propriétés (rapidité d'apparition, agglutinats massifs) du type *H* désigné sous le nom de réaction, antigène-anticorps *H*, mais elle s'en écarte par sa résistance à la chaleur et à certains antiseptiques.

Par là, l'antigène capsulaire, qui caractérise cette agglutination de type, se rapproche de l'antigène somatique *O*. Autre aspect du même phénomène, l'agglutination microscopique se produit également avec une grande rapidité et

sous l'influence exclusive du sérum homologue. Elle s'accompagne d'un *gonflement de la capsule* extrêmement net que nous avons figuré. Ce phénomène s'observe également par action du sérum *in vivo* sur les germes des lésions et des épanchements pathologiques. Il y a là un procédé applicable au diagnostic rapide du type en cause dans une affection à Pneumobacille.

La réaction de *précipitation* donne des résultats étroitement concordants avec ceux de l'agglutination, et se montre également spécifique du type ; au contraire la *fixation du complément* caractérise l'espèce microbienne et s'obtient non seulement avec le sérum homologue mais aussi avec les sérums B et C sur le groupe A et inversement.

III. -- Appliquant les données établies par le Professeur Boivin pour les bactéries gram-négatives nous avons préparé l'antigène *glucido-lipidique* du type A et étudié ses propriétés : opalescence, dialyse, absence des réactions des protéines, précipitation spécifique du type, fixation du complément en présence des trois sérums. *In vivo*, toxicité décelable chez la souris par inoculation par voie péritonéale et sous-cutanée et persistant même après ébullition de la solution en milieu neutre.

IV. — Appliquant cette méthode à l'étude d'une souche polyvalente, nous avons pu, dans cette solution d'antigène glucido-lipidique, faire flocculer successivement les trois complexes A, B et C. Des lapins injectés avec cet antigène nous fourniront vraisemblablement un sérum à action polyvalente.

V. — En possession de diverses souches virulentes, nous avons abordé expérimentalement l'intéressant problème de la chimiothérapie. Malheureusement, les travaux en cours ne sont pas suffisamment avancés pour nous

permettre de donner des résultats d'une grande précision. Notons cependant que les sulfamides présentent, sur les infections à Pneumobacilles, une action préventive très nette qui permet de grands espoirs pour leur application future en thérapeutique.

Vu : le Doyen,
A. DAMIENS.

Vu : le Président de la thèse,
LUTZ.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
G. ROUSSY.

BIBLIOGRAPHIE

- AVERY (O. T.) and GÆBEL (W. F.). — Chemo-immunological studies on the soluble specific substance of Pneumococcus. The isolation and properties of the acetyl-polysaccharide of Pneumococcus. *Journal of exp. Med.*, t. LVIII, p. 731, 1933.
- Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate Proteins. *Journal of exper. Med.*, t. LIV, p. 431, 1931.
- AVERY (O.) and HEIDELBERGER (M.). — Immunological relationships of cell-constituents of Pneumococcus. *Journ. of exp. Med.*, t. XXXVIII, pp. 73-80, 1923 ; t. XL, p. 301, 1924 ; t. XLII, p. 367, 1925.
- BAMFORTH (I.). — An investigation of the bacille of the « capsulatus mucosus » group. *The Journ. of Hyg.*, t. XXVII, p. 343, 1928.
- BERTARELLI. — Ricerche sperimentali sul Pneumobacillo di Friedländer e su alcuni germi affini. *Rev. d'igiene e san. publ.*, t. XI, p. 43, 1905.
- BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L. et I.). — Technique pour la préparation des polysaccharides microbiens spécifiques. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXIV, p. 490, 1933.
- Extraction d'un complexe toxique et antigénique à partir du Bacille d'Aetrick. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXIV, p. 307, 1933.
- Sur la stabilité des complexes polysaccharidiques toxiques et antigéniques renfermés dans les bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXV, p. 309, 1934.
- BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.). — Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries. *Revue d'Immunologie*, t. I, pp. 551-569, 1935 et t. II, pp. 113-144, 1936.

- Les antigènes somatiques et flagellaires des bactéries. Rapport présenté au *1^{er} Congrès intern. des Microbiol. de langue française*, Paris, oct. 1938.
- BORDET (J.). — Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. Paris, Masson, édit., 1920.
- BORDET (J.) et GENGOU. — Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XV, p. 289, 1907.
- BORIN (P.). — Capsule du Pneumobacille de Friedländer. Considérations sur les capsules microbiennes. *Thèse Pharmacie*. Paris, 1925.
- BUTTLE. — Action préventive du p. aminobenzène sulfonamide et d'autres corps du même groupe vis-à-vis des infections streptococciques des souris et d'autres agents pathogènes. *The Lancet*, t. CCXXX, p. 286, 1936.
- BUTTLE et CAMB. — Traitement des infections bactériennes avec des substances dérivées du sulfanilamide. *Proc. Roy. Soc. Méd.*, t. XXI, p. 154, déc. 1937.
- CADO (Y.). — Recherches microbiologiques et biochimiques sur des bactéries muqueuses. *Thèse Pharmacie*. Paris, 1936.
- CHARRIN et ROGER. — Note sur le développement des microbes pathogènes dans le sérum des animaux vaccinés. *C. R. Soc. Biol.*, t. XLI, p. 667, 1889.
- CLAIRMONT (P.). — Differentialdiagnostische Untersuchungen über Kapselbakterien. *Z. f. Hyg. und Infek. Kr.*, t. XXXIX, p. 1, 1902.
- DEMANCHE (R.). — Précis de technique du sérodiagnostic, 2^e édition. Paris, Doin, édit. 1935.
- DOCHEZ (A. R.) and AVERY (O. T.). — The elaboration of specific soluble substances by Pneumococcus during growth. *Journ. of exper. Med.*, t. XXVI, pp. 477-493, 1917.
- DOMAGK, MIETSCH et KLARER. — Contribution à la Chimiothérapie des infections bactériennes. *Deut. med. Woch.*, t. 61, p. 250, 15 février 1935.
- DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.) et CHU (T. H.). — Sur quelques techniques d'isolement et d'identification des microbes des eaux. *Revue d'Hygiène*, t. 53, p. 241, 1931.
- DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.) et KOSOVITCH (N.). — Antigènes.

Hétéro-antigènes et haptènes (1 vol. Baillière et Fils, Edit., Paris, 1937).

EDWARDS (P. R.). — Relationships of the encapsulated Bacilli with special reference to Bact. Aerogenes. *Journ. of Bact.*, t. XVII, p. 339-355, 1929.

ELBERT. — Über die biochemische Eigenschaften des Bac. Frisch und anderer Kapselbakterien. *Ztblatt Bakt. Orig.*, t. CXII, p. 178, 1929.

FÉLIX (A.). — Ueber varianten der Proteus X Stamme. *Zeitschr. f. Immun.*, t. XXXV, p. 57, 1922.

FÉLIX (A.) und MITZENMACHER (F.). — Weitere Untersuchungen über den Nachweis der O und H Rezeptoren bei den Proteus-Stämmen. *Wien. klin. Woch.*, t. XXXI, p. 998, 1918.

FOURNEAU (E.), TREFOUEL (J.) et (Mme J.), NITTI (F.) et BOVET (D.). — Action du p. aminophénylsulfamide sur les moisissures. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXXII, p. 652, 1936.

GERNEZ (CH.). — Diagnostic des infections à Pneumobacille de Friedländer par la déviation du complément. *Soc. Biol. Lille in C. R. Soc. Biol.*, t. CI, p. 66, 1929.

GOEBEL (W.). — The soluble specific substance of Friedländer-Bacillus. *Journ. of Biol. Chem.*, t. LXXIV, p. 619-629, 1929.

GOEBEL (W.) and AVERY (O.). — The soluble specific substance of Friedländer-Bacillus. On the isolation and properties of the specific carbohydrates from type A and C Friedländer-Bacillus. *Journ. of exper. Med.*, t. XLVI, p. 601, 1927.

— Chemoimmunological studies on conjugated carbohydrate proteins: The synthesis of the p. aminobenzyl ether of the soluble specific substance of the III Pneumococcus and its coupling with protein. *Journ. of exper. Med.*, t. LIV, p. 431 et 437, 1931 ; *ibid.*, t. L, p. 521-533, 1929.

GASTINGS and SNIJDERS. — Untersuchungen über das *Sclerome respiratorium* (Sklerom). Die antigene Struktur der Skleromstämme im Vergleich mit den anderen Kapselbakterien. *Zblatt f. Bakt. Orig.*, t. CXXXVI, p. 1, 1936.

GROSS (P.), COOPER (F. B.) and LEWIS (M.). — Sulfamide. Trai-

- tement des infections à Bacille de Friedländer chez la Souris. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, t. XXXIX, pp. 12-13, 1938.
- HEIDELBERGER (M.), AVERY (O.) and GOEBEL (W.). — A « soluble specific substance » derived from gum arabic. *Journ. of exp. Med.*, t. XLIX, p. 847, 1929.
- HEIDELBERGER (M.) and GOEBEL (W.). — The soluble specific substance. On the chemical nature of the aldobionic acid from the specific polysaccharide of type III Pneumococcus. *Journ. of Biol. Chem.*, t. LXXIV, pp. 613-618, 1927.
- HEIDELBERGER (M.), GOEBEL (W.) and AVERY (O.). — The soluble specific substance of a strain of Friedländer Bacillus. *Journ. of exp. Med.*, t. XLII, pp. 701-727, 1925.
- HORNUS (G.). — Structure antigénique et classification des bacilles du groupe des Salmonella. *Revue d'Immunologie*, t. I, p. 488-500, 1935.
- JULIANELLE (L. A.). — A biological classification of Encapsulatus Pneumoniae (F.). *Journ. of exp. Med.*, t. XLV, pp. 113-683, 1926.
- The distribution of Friedländer bacillus of different types. *Journ. of exp. Med.*, t. II, p. 539, 1930.
- A biological classification of *Klebsiella ozenae*. *Journ. of Bact.*, t. XXX, pp. 535-543, 1935.
- Immunological relationships of cell constituents of Encapsulatus Pneumoniae (Friedländer's bacillus). *Jour. of exp. Med.*, t. LXIV, pp. 683 et 735, 1936.
- Immunological specificity of *Bacterium aerogenes* and its antigenic relations to *Pneumococcus* type II and Friedländer: Bacillus type B. *Journ. of Immunology*, t. XXXII, p. 21-33, 1937.
- KLEMPERER et SHEIER. — Über die Identität der Ozena und der Rhinosklerom-Bazillen mit Friedländerschen Bazillen. *Zeit. f. klin. Med.*, t. XLV, p. 133, 1902.
- KLIEWE (F.) et HSU (M.). — Studien über Friedländerbazillen und andere Kapselbakterien. *Z. f. Imm. forschung*, t. LXXXVI, pp. 481-500, 1935.
- LANDSTEINER (K.). — The specificity of serological reactions. 1 vol. London, Baillière, Tindal et Cox, 1936.

- On the formation of heterogenic antigen by combination of hapten and protein. *Proc. of the Konigl. Akad. van Vetenschap. te Amsterdam*, t. XXIII, p. 1166, 1921.
- LEMIERRE. — Pneumobacille de Friedländer in *Traité de Microbiologie de Nattan-Larrier*, t. II, p. 226, 1934.
- LEVADITI (C.) et VAISMAN (A.). — Action curative du chlorhydrate de 4'-sulfamido- 2.s-diaminobenzène et de quelques dérivés similaires dans la streptococcie expérimentale. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXIX, p. 946, 1935.
- LEVADITI (C.), VAISMAN (A.) et KRASSNOFF. — Mécanisme de l'activité chimiothérapique de certains dérivés aromatiques sulfamidés dans l'infection provoquée par le bacille de Friedländer. *Bull. Acad. de Méd.*, t. CXXI, p. 739, 1939.
- LEVY-BRÜHL (M.) et VIALA (M.). — Sur les infections génito-urinaires à Pneumobacille de Friedländer. *Ext. du Jour. d'Ur.*, t. XXXIX, n° 3, mars 1935.
- LEVY-BRÜHL (M.) et COURTOIS (J.). — Classification sérologique des bacilles muqueux. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXXVIII, p. 982, 1938.
- LUTZ (L.). — Contribution à l'étude chimique et botanique des gommés. Lons-le-Saunier, Lucien Declame. Thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie, soutenue le 27 juin 1895.
- Gomme de Canna. *Ext. du Bull. de la Soc. Botanique de France*. Paris, 1897.
- MAGHERU (G. et A.), BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.). — Recherches sur l'antigène « résiduel » des colibacilles. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXX, p. 1279, 1935 ; *ibid.*, t. CXXI, p. 172, 1936.
- MELLON (R. R.), GROSS (P.), COOPER (F. B.). — Sulfanilamide therapy of bacterial infections. 1 vol. 398 p., Ch. C. Thomas, 1938.
- MESROBEANU (Lydia). — Les antigènes glucido-lipidiques des bactéries. (Etude chimique et biologique). *Thèse Sc.*, Université de Strasbourg, Paris, Masson, édit. 1936.
- MEYER (Kurt). — Untersuchungen über antigene Eigenschaften von Lipoiden. *Zeit. f. Immunitätsf.*, t. VII, p. 732, 1910, t. IX, p. 530, 1911 ; t. XI, p. 211, 1911.
- MORRIS (M. C.) and JULIANELLE (L. A.). — A biologic classifi-

- cation of the Bacillus of Rhinoscleroma. *Journ. of Infect. Diseases*, t. LV, p. 150-156, 1934.
- MULLER (H. S.), SMITH (D.) and LITARCZEK (Stella). — « Residue antigen » from a strain of Friedländer Bacillus. *Proc. Soc. exp. Biol.*, t. XXII, p. 373, 1924-1925.
- NETTER (A.). — Présence du bacille encapsulé de Friedländer dans l'exsudat de deux pleurésies purulentes. Considérations générales sur le rôle pathogène de ce micro-organisme. *Soc. méd. des Hôp.*, t. VII, p. 487, 1890.
- NICOLLE (Maurice). — Les antigènes et les anticorps. 1 vol. Paris, Masson, édit., 1920.
- NITTI (F.) et BOVET (D.). — La coupure de certains azoïques dans l'organisme animal et les phénomènes allergiques provoqués par la sulfamido-chrysoïdine, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, t. XIX, p. 837, 1937.
- PAYET (M.). — Dissociation antigénique des bactéries du groupe typho-paratyphique. Thèse Médecine, Paris, 1939.
- PORGES. — Über die Agglutinabilität der Kapselbakterien. *Wiener Klin. Woch.*, t. XVIII, p. 691, 1905.
- PRICA. — Studien über Kapselbakterien (Friedländer). *Centralbl. f. Bakt.*, I, t. CXV, p. 334, 1930.
- POCHON. — Structure antigénique du *B. Pneumoniae*. *Rev. d'Immunologie*, t. III, p. 136, 1937.
- SACHS (H.). — Antigene und Antikörper. In *Handbuch der normalen und patholog. Physiologie*, t. XIII, p. 405, 1929.
- SMALL and JULIANELLE (L.). — Biologic and serologic studies of Bacillus mucosus group. *Journ. of infect. Diseases*, t. XXXII, p. 456, 1923.
- SICARD (A.). — Microbe de l'Ozène. *C. R. Soc. Biol.*, t. LI, p. 813, 1899.
- TILLES (W.), AVERY (O.) and GÆBEL (W.). — Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins. *Journ. of exp. Méd.*, t. L, p. 551, 1929.
- TOENNIESSEN (E.). — Über die Agglutination der Kapselbazillen. *Ctbl. f. Bakt. Orig.*, t. LXXV, p. 329, 1915.
- Untersuchungen über die Kapsel der pathogenen Bakterien. *Zeit f. Bakt.*, t. LXXX, p. 225, 1921.
- TOMESIK (J.). — On carbohydrate like specific substances in

- the colon-aerogenes group. *Proc. Soc. exp. Biol. Méd.*, t. XX, p. 810, 1927.
- TOPLEY (W. W. C.) and WILSON (G. S.). — The principles of Bacteriology and Immunity, 1 vol. New-York, Wm Wood et C^o, 1936.
- TRÉFOUEL (J.) et Mme (J.), NITTI (F.) et BOVET (D.). — Activité du p. amino-phényl-sulfamide sur les infections streptococciques expérimentales de la souris et du lapin. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXXX, p. 736, 1935. *Ann. Institut Pasteur*, t. LVIII, p. 30, 1937.
- TRÉFOUEL (J.) et Mme (J.), NITTI (F.), BOVET (D.) et HAMON (Mlle V.). — Rapport entre la vitesse de réduction des matières colorantes azoïques et leurs propriétés thérapeutiques. *Rapport présenté au I^{er} Congrès intern. des Microbiol. de langue française*. Paris, oct. 1938 ; *C. R. Soc. Biol.*, t. CXXIX, p. 950, 1938.
- TROISIER, BARIÉTY et BROUET. — Le diagnostic rapide des pneumococcies. *Presse Médicale*, t. LXXXII, p. 121 et 250, 1937.
- UHLENHUTH (P.). — Eine Methode zur Unterscheidung der verschiedenen Blutarten im besonderen zur differential diagnostischen Nachweise des Menschenblutes. *Deutsch. med. Woch.*, pp. 82, 260, 1901.
- UHLENHUTH (P.) und REMY (E.). — Frage der Antikörper gegen Kohlenhydrate. *Zeitschr. für Immunitätsf.*, t. LXXXV, p. 328, 1935.
- WEICHSELBAUM. — Über die Aetiologie der akuten Lungen und Rippenfellen Entzündungen. *Wiener med. Jahrb.*, t. VIII, p. 483, 1886.
- WEIL et FELIX. — Zur Frage der Spezifität der X. Stämme in der Weil-Felizschen Agglutination bei Fleckfieber (Typhus). *Wien. klin. Woch.*, t. XXX, pp. 1158-1159; 1918.
- Ueber die Bedingungen der Agglutininildung des Fleckfieber. Virus. *Wien. klin. Woch.*, t. LXXXIII, pp. 655-657, 1920.
- WIDAL. — Sérodiagnostic de la fièvre typhoïde. *Soc. méd. Hôp.*, t. XIII, p. 561, 1896.
- ZOZAYA (S.) and CLARK (J.). — Active immunization of mice with the polysaccharides of Pneumococci, types I, II and III. *Journ. of. exp. Med.*, t. LVI, p. 21, 1932.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
AVANT-PROPOS	9
Plan	11
INTRODUCTION	13

CHAPITRE PREMIER

Historique. Classification sérologique.

Premiers essais	15
Classification de Julianelle	16
Résultats	17
Agglutination	17
Saturation des agglutinines	18
Culture en filaments	18
Pouvoir protecteur	18

CHAPITRE II

Antigènes et haptènes microbiens.

I. Généralités : Définition des antigènes	21
Méthodes de dissociation	22
Haptènes	22
II. Complexe glucido-protidique	23
III. Complexe glucido-lipidique	23

Préparation.....	25
Propriétés physicochimiques et immunologiques.....	25
Dissociation	26

CHAPITRE III

Polyholosides des Pneumobacilles.

Caractères généraux.....	27
Méthode d'extraction.....	28
Etude de la fraction glucidique du type A.....	29
Composition moléculaire.....	29
Propriétés.....	29
Analogie avec les polyholosides du Pneumocoque III.....	29
Fraction glucidique du type B.....	30
Analyse physicochimique.....	30
Propriétés immunologiques.....	30
Comparaison avec le Pneumocoque II	30
Fraction glucidique du type C.....	30
Remarque	31

CHAPITRE IV

Classification sérologique des souches françaises.

I. Préparation des sérums.....	33
Immunisation des animaux.....	34
II. Agglutination macroscopique.....	34
Principe	34
Préparation de l'émulsion microbienne.....	34
Technique de la réaction.....	35
Tableau.....	35
Résultats.....	36
Taux d'agglutination.....	37
Comparaison avec la classification américaine.....	37
III. Précipito-réaction.....	39
Formules des milieux de cultures.....	39
Technique de préparation	39

Réaction	40
Résultats	40
Comparaison avec la classification basée sur l'agglutination	41
IV. Fixation du complément	42
Principe	42
Préparation des antigènes	43
Technique de la réaction	43
Résultats	44
Tableau résumant la réaction	45
Différence avec les 2 autres réactions	45

CHAPITRE V

Analyse des réactions séro-immunologiques.

I. Caractères de l'agglutination macroscopique	47
Définition des antigènes H et O	47
Propriétés de ces antigènes	48
Interprétation de nos réactions	49
II. Agglutination microscopique	50
Colorant	50
Aspect de la préparation	50
III. Gonflement de la capsule	51
Historique	51
Réaction <i>in vitro</i>	51
Réaction <i>in vivo</i>	52
Applications aux Etats-Unis	52

CHAPITRE VI

Antigène glucido-lipidique du *Pneumobacille A*.

Principe de la préparation	53
Technique	53
Propriétés immunologiques	55
Précipito-réaction	55
Fixation du complément	59
Propriétés <i>in vivo</i>	60

CHAPITRE VII

Etude d'une souche polyvalente.

Résultats d'agglutination.....	61
Antigène glucido-lipidique.....	61
Précipito-réaction.....	62
Saturation fractionnée.....	62
Pouvoir toxique.....	62

CHAPITRE VIII

Applications. Chimiothérapie.

I Gonflement de la capsule.....	65
II. Sérothérapie.....	65
III. Chimiothérapie.....	65
Historique.....	65
Expériences récentes.....	66
Technique de nos essais.....	67
Résultats.....	68

CONCLUSIONS

Classification	71
Fréquence des différents types.....	71
Souches polyvalentes.....	71
Antigène glucido-lipidique.....	72
Chimiothérapie.....	72
BIBLIOGRAPHIE.....	75

3232. — Imp. Jouve et Cie, 15, rue Racine, Paris. — 6-1939
